

Endotheliale Dysfunktion bei inhalativem Rauchen :
Beeinflussbarkeit durch Nikotinkarenz und Gabe von Antioxidantien

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus – Liebig – Universität Gießen

vorgelegt von Sabrina Mehlhorn, geborene Ciesiolka
aus Duisburg

Gießen 2013

Aus der Medizinischen Klinik I

Abteilung für Kardiologie und Angiologie

Prof. Dr. C. Hamm

Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH

Standort Gießen

Gutachter : Prof. Dr. D. Sedding

Gutachter : Prof. Dr. J. Schneider

Tag der Disputation : 28.11.2013

Abkürzungsverzeichnis

ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BMI	Body Mass Index
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CNP	C – natriuretisches Peptid
CRP	C – reaktives Protein
EDHF	Endothelial derived hyperpolarisation factor
EDNO	Endothelial derived Stickstoffmonoxid
EDRF	Endothelial derived relaxing -factor
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid – Synthase
EPC	Endotheliale Vorläuferzellen
FAD	Flavin – Adenosin – Dinukleotid
FGF	Fibroblast growth factor
FMD	Flussmodulierte Dilatation
FMN	Flavin – Mononukleotid
GSNO	S – Nitrosoglutathion
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HbO ₂	Oxyhämoglobin
HDL	High – Density – Lipoprotein
ICAM1	Intercellular adhesion molecule – 1

IE	Internationale Einheiten
IGF	Insulin like growth factor
IL1b	Interleukin - 1 b
IL6	Interleukin - 6
i.v.	intravenös
LDL	Low – Density - Lipoprotein
Lp _a	Lipoprotein a
MetHb	Methämoglobin
MONICA	Monitoring Cardiovascular Disease – Studie der Weltgesundheitsorganisation über kardiovaskuläre Risikofaktoren
NaCl	Kochsalz
NADPH	Nicotinamiddinukleotidphosphat
NHANES III	Third National Health and Nutrition Examination Survey
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
N ₂ O ₃	Distickstofftrioxid
NOHb	Nitrosylhämoglobin
NOS	Stickstoffmonoxid – Synthase
O ₂ ⁻	Superoxidradikationen
OH [°]	Hydroxylradikale
ONOO ⁻	Peroxynitrit

PDGF	Platelet derived growth factor
PMN	Polymorphkernige neutrophile Leukocyten
py	Packyears (Anzahl gerauchter Jahre / 1 Schachtel / Tag / Jahr)
RNNO	Nitrosamine
RSNO	Nitrothiole
RXNO	Häm – Nitroverbindungen
TNF α	Tumornekrosefaktor α
VCAM – 1	Vascular cell adhesion molecule – 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Atherosklerose	1 – 5
1.2.	Metabolismus von Stickstoffmonoxid	5 – 8
1.3.	Endotheliale Dysfunktion	8 – 16
1.4.	Einfluss des Rauchens auf die NO – Bioverfügbarkeit / Rauchen als Risikofaktor	17 – 23
1.5.	Einfluss von Vitamin C auf die Endothelfunktion	23 – 24
1.6.	Fragestellung der Arbeit	24
2.	Material und Methoden	25
2.1.	Studienprotokoll	25
2.2.	Studienkollektiv	25 – 26
2.3.	Duplexsonographische Bestimmung der endothelabhängigen Dilatation der Arteria brachialis	26 – 29
2.3.1.	Untersuchungsprotokoll	29 – 33
2.3.2.	Prinzip der sonographischen Bestimmung des arteriellen Durchmessers	33 – 34
2.4.	Laborbestimmungen	34
2.4.1.	Blutentnahme	34
	Bestimmungen der Laborparameter	34

2.4.2.	Bestimmung des Kotininspiegels	35
2.4.3.	Statistische Verfahren	35
2.5.		36 – 37
3.	Ergebnisse	37
3.1.	Charakterisierung der Studienpopulation	37 – 38
3.2.	Flussmodulierte Vasodilatation (nativ)	38 – 39
3.3.	Flussmodulierte Vasodilatation mit Vitamin C	40 – 42
3.4.	Vasodilatation nach Nitroglyceringabe	42 – 43
4.	Diskussion	43
4.1.	Wesentliche Ergebnisse	43
4.2.	Methodenkritik	44
4.2.1	Messung der endothelialen Dysfunktion mit Hilfe der fluss- vermittelten Dilatation	44 – 47
4.3.		
4.4.	FMD und Nikotinkonsum	47 – 49
4.5.	FMD und Vitamin C	49 – 51
	Klinische Bedeutung und Ausblick	51 – 52
5.1.	Zusammenfassung	52 – 53
5.2.	Summary	54 – 55
6.	Tabellenanhang	56 – 66
7.	Literaturverzeichnis	67 – 81
8.	Danksagung	82

1. Einleitung

1.1. Atherosklerose

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen eine der Haupttodesursachen in der westlichen Welt dar. Allein 2004 starben 17 Millionen Menschen weltweit durch kardiovaskuläre Ursachen (1). Trotz eines neuen Gesundheitsbewußtseins, das eine Änderung des Lebensstils beinhaltet sowie pharmakologischen Hilfsmitteln zur Reduktion des Cholesterinspiegels nimmt die Mortalität weiter zu. Der überwiegende Teil kardiovaskulärer Todesfälle geht hierbei auf atherosklerotische oder atherothrombotische Erkrankungen zurück.

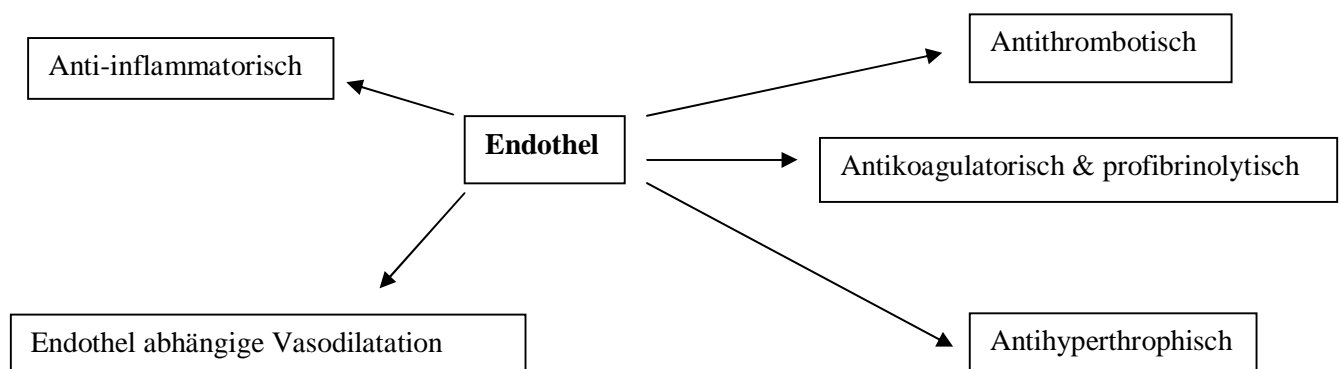
Nach heutigem Verständnis ist die Atherosklerose eine entzündliche Gefäßerkrankung (2-5), die vor allem mittlere und große Arterien betrifft (3). Risikofaktoren für die Entwicklung einer Atherosklerose sind u.a. erhöhte LDL – Spiegel (3-7), Diabetes mellitus (4-7), Nikotinabusus (5,6), arterielle Hypertonie (4-7) und genetische Veranlagung (5).

Als Initialzündung der Entstehung von Atherosklerose versteht man einen Funktionsverlust des Endothels, die sogenannte endotheliale Dysfunktion. Diese tritt bereits vor den ersten morphologisch fassbaren Veränderungen auf.

Die pathogenetisch initialen Veränderungen bei der Atheroskleroseentstehung betreffen die innerste Zellschicht der Gefäßwand, die Intima. Diese besteht aus einer einzigen Schicht von Endothelzellen, die neben einer reinen Barrierefunktion noch zahlreiche andere Funktionen ausübt (s. Abb. 1) (8). Neben parakrinen weist es auch endokrine Funktionen auf. Das Endothel ist in der Lage, je nach Abhängigkeit des Organs eine unterschiedliche Permeabilität aufzuweisen. Diese Permeabilitätsänderungen sind von den „tight junctions“, deren Moleküle, die Cadherinen, die die eigentliche Barrierefunktion übernehmen, abhängig (9). Das Endothel wird durch die Wirkung von Stickstoffmonoxid, Prostazyklin, Angiotensin II, Endothelin und PDGF u.a. für Lipoproteine durchlässiger (s. Abb. 2) (5). Zudem nimmt die prokoagulatorische Wirkung des Endothels zu (5). Unter physiologischen Bedingungen kommt es aufgrund der antithrombotischen Eigenschaften des Endothels zu keinem Anhaften der Zellen an der Oberfläche. Das intakte Endothel bildet fibrinolytisch wirksame und die Blutgerinnung hemmende Moleküle, wie z.B. den plasminogenaktivierenden Faktor und das Thrombomodulin, das Thrombin deaktiviert. Bei einer Schädigung der Zellen wird Thrombomodulin nicht mehr

gebildet und das Endothel wird thrombogen (9). Durch eine Inhibierung der Leukocytenadhäsion und –migration verfügt das Endothel über eine antiinflammatorische und durch die Hemmung der Zellproliferation und Migration der glatten Muskelzellen zugleich über eine antihypertrophische Wirkung (s. Abb. 1). Weiterhin reguliert das Endothel über die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO, vasodilatierend) und Endothelin (vasokonstringierend) Gefäßweite und –tonus.

Abbildung1 : Wirkungen des Endothels



Modifiziert nach : “Landmesser U, Hornig B, Drexler H; Endothelium Function : A Critical Determinant in Atherosclerosis ?; Circulation; 2004; 109”

Gleichzeitig werden Zytokine und Wachstumsfaktoren produziert. Falls der atheroskleroseauslösende Faktor nicht beseitigt wird, schreitet der Prozess der Atheroskleroseentstehung weiter voran, indem die Einwanderung und Proliferation von Muskelzellen gefördert wird. Daraus resultiert bei fortschreitender Anlagerung von Muskelzellen das sogenannte „Remodelling“ (5). Zur Verhinderung einer Lumeneinengung bei fortschreitender Verdickung der arteriellen Wand kompensiert das Endothel diese Einengung mit einer anpassenden allmählichen Erweiterung des Gefäßlumens. Durch die gesteigerte Chemotaxis von Monozyten, die nach ihrer Einwanderung ins Gewebe zu Makrophagen werden sowie der Einwanderung von T-Lymphocyten und deren Aktivierung mit Freisetzung von hydrolytischen Enzymen, Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren wird ein weiterer Schaden sowie eine lokale Nekrose induziert (3,4). Hieraus resultiert bei weiterer Einwanderung von Makrophagen und Muskelzellen ein Umbau der Läsion mit der Entstehung einer

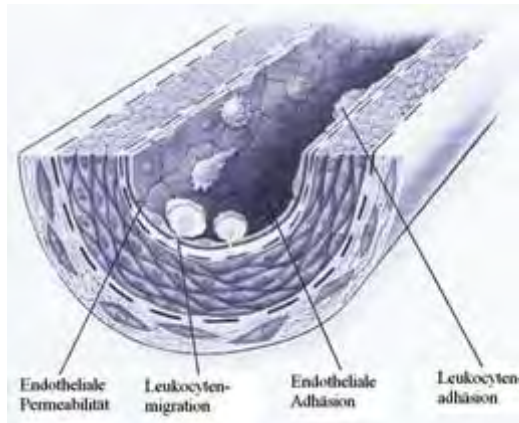
fibrotischen Kappe, die den lipidhaltigen Kern und das nekrotisierende Gewebe überdeckt (3) (s. Abb. 4). In diesem Stadium ist die Arterie nicht mehr in der Lage mit einer kompensatorischen Dilatation entgegenzuwirken (5).

Die ersten pathologisch bzw. anatomisch sichtbaren Veränderungen im Prozess der Atheroskleroseentstehung treten bereits im Kindesalter auf. Dabei handelt es sich um eine rein entzündliche Läsion, den sogenannten „Fatty streak“, der aus Makrophagen und T-Lymphocyten besteht (2, 3, 5) (s. Abb. 3).

Eine Hauptursache in der Entstehung der Atherosklerose stellen die durch oxidierte LDL verursachten Veränderungen von Phospholipiden und die Makrophagenaktivierung, die zur Gefäßschädigung führt, dar (10) (s. Abb. 5). Diese ist auch von der Menge des LDL – Cholesterins und somit der LDL – Cholesterinkonzentration im Blut abhängig. Wenn sich LDL in der Arterie anlagert, wird es oxidiert (2-5,11-13). Zudem wird durch oxidierte Phospholipide die Bindung von Monocyten ans Endothel sowie die Stimulation zur Bildung von Makrophagen colony stimulation factor gefördert.

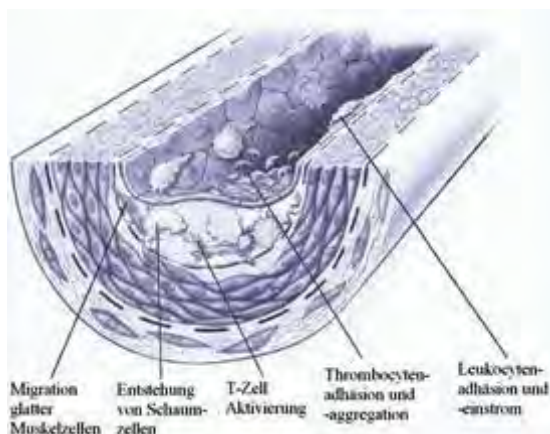
Die oxidierten Phospholipide werden im Endothel anschließend von Makrophagen aufgenommen. Diese werden durch die vereinfachte Anhäufung von Cholesterolestern zu aktivierten Schaumzellen (foam cells) (3,12). Durch oxidiertes LDL wird zudem die Einwanderung von Leukocyten in die Arterienwand sowie die Aktivierung von Thrombocyten induziert (3).

Abbildung 2 : Erste Endothelveränderungen



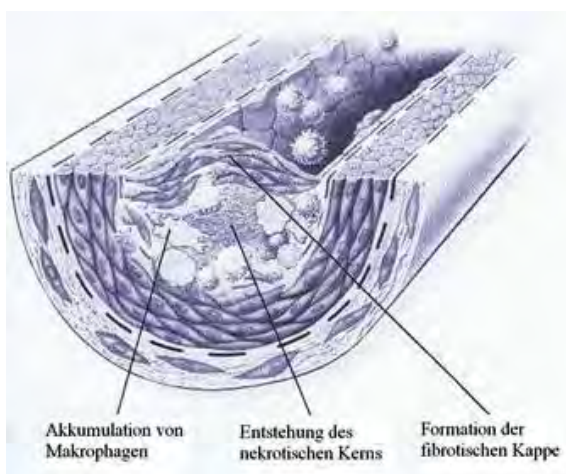
Erste atherosklerotische Veränderungen des Endothels. Erhöhte endotheliale Permeabilität für Lipoproteine und andere Plasmabestandteile, was durch NO, Prostacyclin, PDGF, Angiotensin II und Endothelin vermittelt wird. Hochregulation der Leukozytenadhäsionsmoleküle (z.B. L-Selectin etc.) und endothelialen Adhäsionsmoleküle (z.B. E-Selectin). Leukozytenmigration in die arterielle Wand, was z.B. durch oxidiertes LDL vermittelt wird.

Abbildung 3 : Entstehung von Schaumzellen



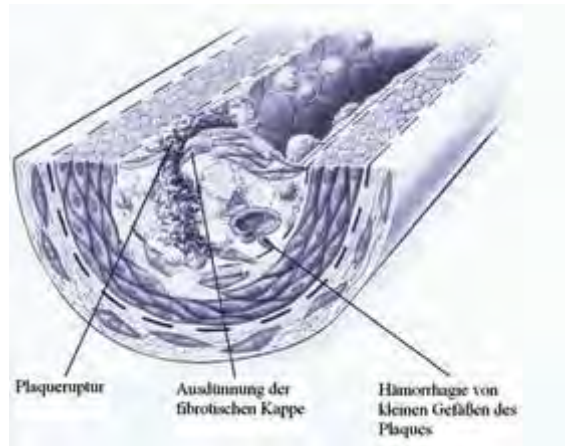
Formation des Fatty Streak (Monocyten, Schaumzellen (Makrophagen), T-Lymphocyten). Migration glatter Muskelzellen z.B. durch PDGF vermittelt, T-Zell-Aktivierung z.B. durch $\text{TNF } \alpha$ vermittelt. Entwicklung von Schaumzellen z.B. durch oxidiertes LDL verursacht, Thrombozytenaggregation z.B. durch Integrine verursacht.

Abbildung 4 : Entstehung der fibrotischen Kappe



Entstehung einer fibrotischen Kappe (Leukozyten, Lipide), die ins Gefäßlumen ragt. Kontinuierliche Leukozytenadhäsion an der Läsion. Entstehung der fibrotischen Kappe u.a. durch PDGF und $\text{TNF } \alpha$ vermittelt.

Abbildung 5 : Ruptur des Plaque



Ruptur der fibrotischen Kappe bzw. des fibrotischen Plaque. Dies geschieht durch Ausdünnung der fibrotischen Kappe, welche u.a. durch Aktivierung von Makrophagen verursacht wird. Diese setzen z.B. Metalloproteinasen frei, die zu Hämorrhagien der Vasa vasorum führen können.

Modifiziert nach : “Ross R., *Atherosclerosis – An Inflammatory Disease*; NEJM; 1999; 340;2”

1.2. Metabolismus von Stickstoffmonoxid

Ein wichtiger Aspekt bei der endothelialen Dysfunktion stellt die eingeschränkte Verfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) dar (14,15). Aus diesem Grund soll zunächst auf den Metabolismus und die biochemischen Eigenschaften von Stickstoffmonoxid eingegangen werden.

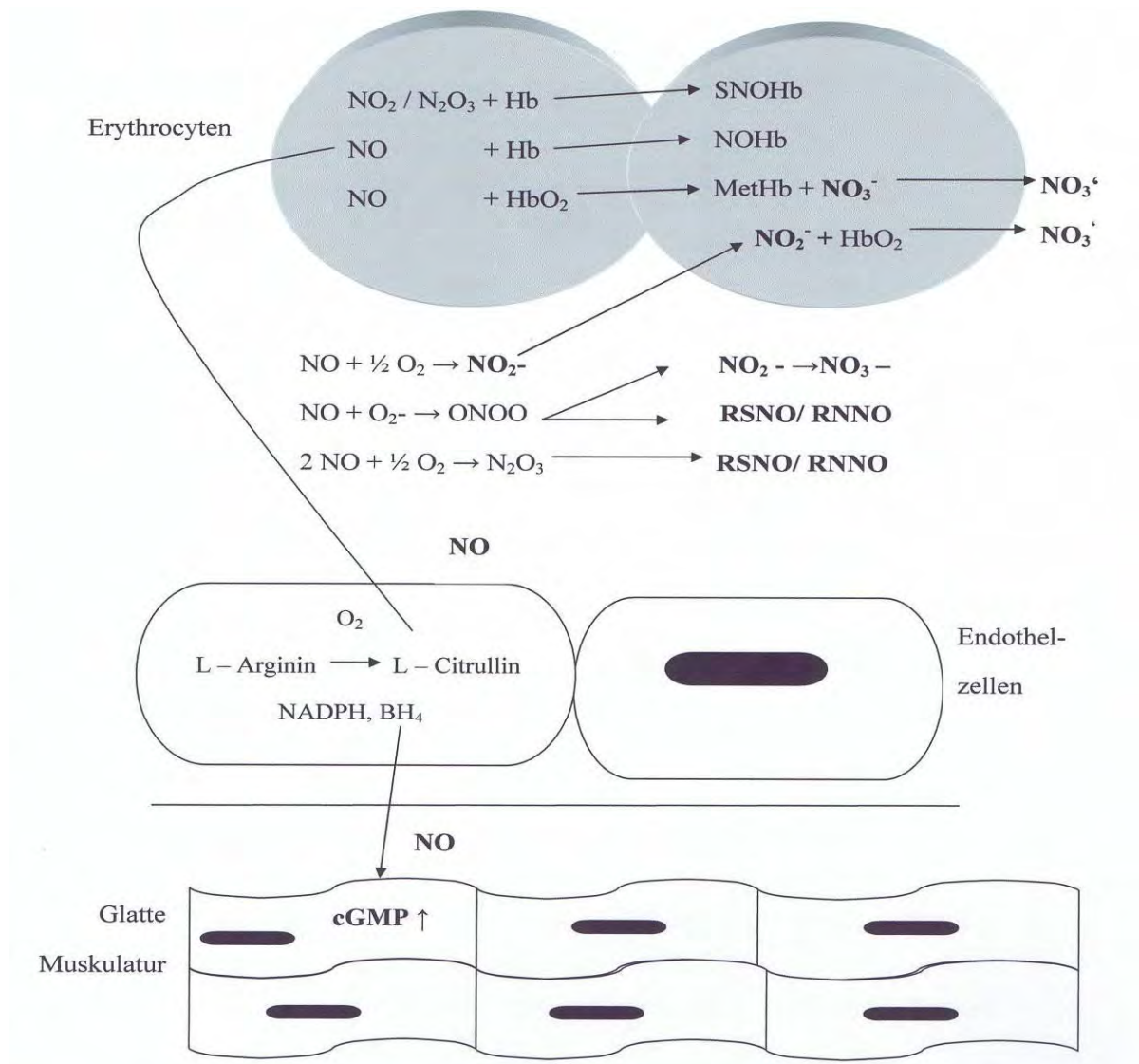
Furchgott und Zawadzki (16) entdeckten schon 1980, dass isolierte Gefäße nur bei einem intakten Gefäßendothel auf Acetylcholin und Bradykinin mit Vasodilatation reagieren, wohingegen nach der Entfernung des Endothels eine Vasokonstriktion erfolgte. In den darauffolgenden Jahren belegten immer mehr wissenschaftliche Arbeiten, dass Endothelzellen kontinuierlich und unter Stimulation mit vasoaktiven Mediatoren eine kurzlebige Substanz freisetzen. Diese bewirkte eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und eine Hemmung der Thrombocytenadhäsion. Zunächst war die chemische Struktur dieser neuen Substanz unbekannt, weshalb man sie zuerst als „Endothelium-derived-relaxing-factor“ (EDRF) bezeichnete (17). In den darauffolgenden Jahren konnten Palmer et al. (18), Ignarro et al. (19) sowie Kelm et al. (20) nachweisen, dass der von den Endothelzellen unter basalen und stimulierten Bedingungen freigesetzte EDRF mit Stickstoffmonoxid (NO) identisch ist.

Die Bildung von NO geschieht im Endothel aus L-Arginin (20-22). In einer Redoxreaktion wird durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) NO und L – Citrullin (23,24) gebildet. Diese ist ein primär gebundenes Protein, welches in den Caveolae der Membran gespeichert wird (22). Die Oxidationszahl des Stickstoffatoms im L-Arginin beträgt -3 und steigt nach der Oxidation zum NO auf +2 auf. Somit findet ein Nettotransfer von 5 Elektronen statt. Weitere Cofaktoren bei dieser Reaktion stellen u.a. BH_4 , NADPH, FAD, FMN und molekularer Sauerstoff dar (25,26).

In biologischen Medien ist Stickstoffmonoxid sehr labil und hat im Vollblut lediglich eine kurze Halbwertszeit von 5,6 Sekunden bei 37°C Körpertemperatur (22,27). Das farblose Gas kann als freies Radikal mit einem ungepaarten Elektron und neutraler Ladung frei über die Zellmembran hinweg aus der Gefäßendothelzelle in die glatten Muskelzellen der Gefäßwand und ins Gefäßlumen diffundieren. In der glatten Muskelzelle der Gefäßwand bewirkt NO über eine Aktivierung der Guanylatzyklase und die Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels eine Vasodilatation (25,27) und eine Verringerung sowie Aggregation von Thrombocyten (21). Im Vollblut hingegen wird NO durch Oxidation zu Nitrit und Nitrat abgebaut (26). Durch die Reaktion mit molekularem Sauerstoff wird der Großteil des gebildeten NO zu Nitrit abgebaut (28,29). Mittels weiterer Oxidation mit oxygeniertem Hämoglobin innerhalb der Erythrocyten entsteht Nitrat unter Bildung von Methämoglobin (30). Eine weitere Abbaumöglichkeit stellt die direkte Oxidation mit HbO_2 zu Nitrat im Vollblut dar. Dies geschieht nach der Diffusion in einen Erythrocyten unter Methämoglobinbildung (31-33). Eine Übersicht über die Stoffwechselwege des NO gibt Abbildung 6 wieder.

Neben NO produziert die eNOS in Abhängigkeit der Verfügbarkeit von L-Arginin und dem Redoxzustand der Kofaktoren auch Superoxidradikationen (O_2^-) (31). Diese Ionen sowie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (23) und Hydroxylradikale (OH^\bullet) können auch am oxidativen Abbau von NO beteiligt sein (34,35). Bei oxidativem Stress (36), der zur vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führt, gewinnt dieser Abbauprozess an Bedeutung. Bei der Reaktion von O_2^- mit NO entsteht Peroxynitrit (23,33), welches als starkes Oxidationsmittel über eine Veränderung von Biomolekülen zytotoxisch wirken kann (37). Als Katalysator der Reaktion von Wasserstoffperoxid mit Nitrit zu toxischen Sauerstoffspezies dient die Myeloperoxidase. Dieser Prozess führt vermutlich durch die vermehrte Oxidation von LDL zur Bildung von Atherosklerose.

Abbildung 6 : Schematische Darstellung einiger Stoffwechselwege des NO - Metabolismus



Nach Freisetzung von NO in das Gefäßlumen wird es mit molekularem Sauerstoff (O_2) zu Nitrit (NO_2^-) abgebaut. Im Erythrocyten reagiert NO_2^- mit oxygeniertem Hämoglobin zu Nitrat (NO_3^-). Im Plasma reagiert NO mit Superoxidanionen (O_2^-) zu Peroxynitrit (ONOO^-), das zu Nitrat (NO_3^-) abgebaut wird. NO kann auch über Bildung von Distickstofftrioxid (N_2O_3) mit Thiolen oder Aminen zu Nitrothiolen (RSNO) und Nitrosaminen (RNNO) reagieren. Im Erythrocyten entsteht bei der Reaktion von NO mit oxygeniertem Hämoglobin NO_3^- und Methämoglobin (MetHb). Mit deoxygeniertem Hämoglobin entsteht Nitrosylhämoglobin (NOHb) oder S-nitrosohämoglobin (SNOHb).

Modifiziert nach : „Einfluss von Kakaoflavanolen auf die endotheliale Dysfunktion bei Rauchern, D. Finis“

Eine weitere Möglichkeit des Vorliegens von NO scheint die Zirkulation von NO als bioaktive, reversibel gebundene Form im Blut zu sein. Vor allem Thiolgruppen von Plasmaproteinen wurden als NO-Akzeptoren beschrieben (29). Der Transport des plasmatisch gebundenen NOs scheint zu einem Großteil an Albumin (38) zu geschehen. Zudem besteht die Möglichkeit der Bindung an niedermolekulare Verbindungen wie Cystein und Glutathion. Die plasmatischen S-Nitrothiole (32,39,40) werden in ihrer Gesamtheit als RSNOs (38,41) bezeichnet. Durch Temperatur, Licht, Ascorbat oder Übergangsmetalle kann die Freisetzung von NO aus S-Nitrosothiolen beeinflusst werden. Die Halbwertszeit von S-Nitrosoalbumin im Plasma beträgt im Gegensatz zur kurzen Halbwertszeit (1 – 2 s) von freiem NO 15-40 Minuten. Rassaf et al. (29) konnten nach der Infusion von S - Nitroglutathion (GSNO) ähnliche Effekte wie nach der Infusion einer NO-Lösung sowie einen Anstieg der RSNO-Konzentration im Plasma nachweisen. Somit scheinen S-Nitrosothiole als physiologische Speicherform von bioaktivem NO zu sein.

NO kann, außer an Thiolgruppen, noch an andere Gruppen gebunden werden, wie z.B. an Stickstoffatome von Proteinen. Diese werden dann als N-Nitrosamine oder RNNOs bezeichnet. Zudem existieren Eisen-Nitrosyle und Lipidverbindungen sowie die Möglichkeit der Bindung an die Häm-Gruppe im Hämoglobin analog zum Sauerstoff. NO kann zudem mit aromatischen Aminen, Verbindungen, Alkoholen, Thiolen und Metallen reagieren, um C-, N-, S-, O- und Metall-Nitrosoverbindungen zu formen. Von physiologischer Bedeutung scheinen im menschlichen Organismus RNNOs, RSNOs und Häm-Nitrosoverbindungen zu sein (33). Diese werden im Folgenden als RXNO bezeichnet. Bislang wurde eine vasodilatierende Wirkung nur für RSNOs belegt (34).

In mehreren Studien wurde zudem nachgewiesen, dass während körperlicher Betätigung, wie z.B. beim Sporttreiben, durch die Erhöhung der cardialen und skelettalen Durchblutung die Bereitstellung von O₂ sowie die Entstehung von Shear Stress gefördert wird. Daraus resultiert eine Erhöhung der NO – Produktion (22,33).

1.3. Endotheliale Dysfunktion

Das Endothel ist ein großes autokrines, parakrines und endokrines Organ (42-45), welches die Vasoaktivität, die Thrombocytenaggregation, Monocytenadhäsion, Hämostasis, Thrombo-

lyse, Entzündungsprozess etc. beeinflusst (6,7,46-52). Es kleidet alle Gefäße des menschlichen Körpers von innen aus und stellt somit eine Grenzschrift zwischen dem Blut und dem perivaskulären Gewebe dar (52). Durch Strukturen wie die Oberflächenglykokalix, Zell – Zell-Verbindungen, aktive Transportmechanismen, transzelluläre Kanäle, Mikrovesikel und subendotheliale Matrix stellt es eine selektiv permeable Barriere dar. Durch die Expression von verschiedenen Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, Insulin, IGF („insulin growth factor“), VEGF („vascular endothelial growth factor“), FGF („fibroblast growth factor“) und Zytokinen können zelluläre Signale weitergeleitet werden (15,42,53,54).

Zudem produziert das Endothel vasoaktive Peptide und Hormone. Vasodilatoren wie Nitritoxid (NO), Prostacyclin, Bradykinin, EDHF („Endothel derived hyperpolarisation factor“), Adrenomedullin, C - natriuretisches Peptid (CNP) und Vaokonstriktoren wie Angiotensin II, Endothelin-1, Thromboxan A₂, Prostaglandine und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) zählen dazu (17,42,53,55-59). Eine Übersicht über die wichtigsten im Endothel synthetisierten Substanzen gibt Abbildung 7 wieder. Mithilfe dieser Substanzen verfügt das Endothel über eine antiarteriosklerotische Wirkung. Darunter fallen die Modulation des Gefäßdurchmessers (27), die Hemmung der Einwanderung von Entzündungszellen, die antiproliferative Wirkung gegenüber glatten Muskelzellen und die Hemmung der Thrombocytenaggregation (6,60,61) (s. Abb. 8). Die Störung dieser Funktionen bezeichnet man als endotheliale Dysfunktion. Diese kann schon in früher Kindheit vor jeglicher Plaqueentstehung vorliegen (15,62,63).

Eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Arteriosklerose ist die Schädigung der Gefäßwand durch verschiedene Faktoren. Neuere Erkenntnisse belegen zudem noch die Auswirkung der endothelialen Dysfunktion, verbunden mit der eingeschränkten Verfügbarkeit von NO bei der Entstehung der Arteriosklerose (56,57,59,63-69). Die endotheliale Dysfunktion stellt den Ursprung der Arteriosklerose dar. Als Initialzündung der Atherosklerose ist sie diagnostisch fassbar, aber noch reversibel. Wenn das Gleichgewicht zwischen Vasodilatation und Vasokonstriktion, Inhibierung und Stimulation der Entstehung und Migration von glatten Muskelzellen etc. nicht mehr gewährleistet ist, resultiert daraus ein dysfunktionales Verhalten und das Endothel nimmt den ersten Schaden (49). Die daraus folgenden Auswirkungen eines Endothelschadens in Bezug auf die Entstehung von Atherosklerose sind im Teil über die Entstehung von Atherosklerose schon ausgeführt worden.

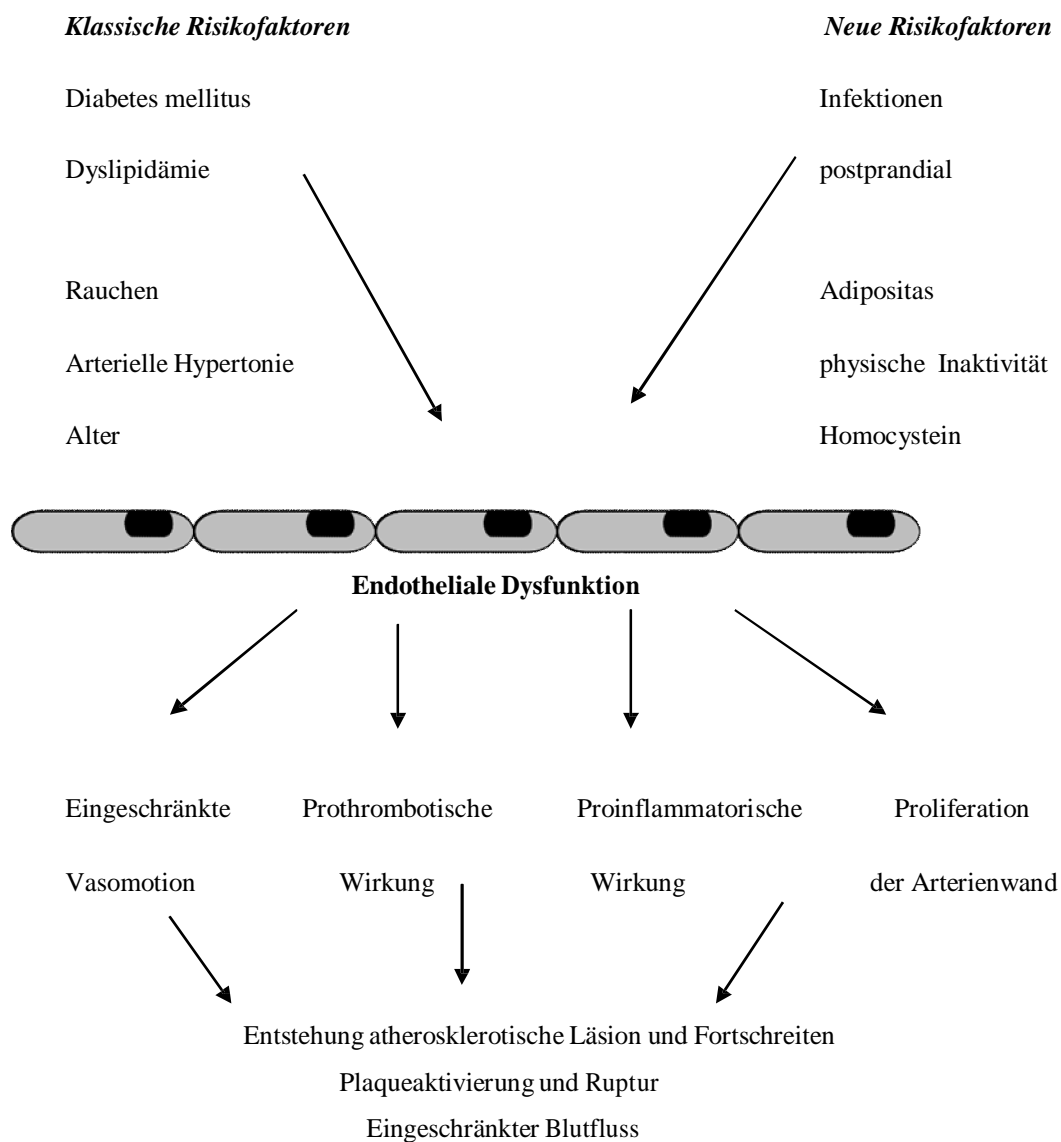
Abbildung 7 : Vom Endothel freigesetzte Substanzen

<i>Vasodilatoren</i>	<i>Vasokonstriktoren</i>
NO	Angiotensin II
Bradykinin	Endothelin
Prostacyclin	Thromboxan A ₂ , Serotonin, Arachidonsäure, Prostaglandin H ₂ , Thrombin, Nicotin
Endothelium derived relaxing factor	
Serotonin, Histamin, Substanz P	Inhibitoren des Wachstums glatter Muskelzellen
Aktivatoren des Wachstums glatter Muskelzellen	NO, Prostacyclin, Bradykinin
Platelet derived growth factor	Heparinsulfat
Basic fibroblast growth factor	Transforming growth factor
Insulin like growth factor	Thrombolytische Faktoren
Endothelin, Angiotensin II	Tissue-type Plasminogen Activator
	Plasminogen Activator Inhibitor -1
Adhäsionsmoleküle	Thrombomoduli
Endotheliales Leukocyten Adhäsionsmolekül	
Intercelluläres Adhäsionsmolekül	
Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül	

Modifiziert nach : „Drexler H, Factors involved in the Maintenance of Endothelial Function, American Journal of Cardiology. 1998; 82; 3S-4S & Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Vita JA, The Clinical Implications of Endothelial Dysfunction, Journal of the American College of Cardiology. 2003; 42; 1149-1160”

Bereits 1961 wurden im Rahmen der Framinghamstudie (13,70,71) sowie 1978 in der PROCAM-Studie (72) verschiedene kardiovaskuläre Risikofaktoren validiert. Darunter zählen das Rauchen, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie und die Hypercholesterinämie. Neuen Studien zufolge zählen auch erhöhte Homocysteinspiegel sowie CRP-Spiegel zu den Risikofaktoren (69,73-77).

Abbildung 8 : Risikofaktoren, Endotheliale Dysfunktion und ihre Auswirkungen



Modifiziert nach : "Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Vita JA; The Clinical Implications of Endothelial Dysfunction; Jorنال of the American College of Cardiology; 2003; 42; 1149 – 1160"

Eine fettreiche Mahlzeit kann auch zu einer vorübergehenden endothelialen Dysfunktion führen (15,78).

Zur Beurteilung der endothelialen Funktionsfähigkeit können neben biochemischen Markern der endothelialen Integrität (Messung von Plasmaspiegeln, von Willebrand Faktor, Thrombomodulins o. ä.) auch bildgebende Methoden herangezogen werden.

Hierbei unterscheidet man invasive und nicht-invasive Verfahren. Für beide Verfahrensansätze verwendet man die endothelabhängige Vasodilatation (79,80). Der Fokus dieser Verfahren liegt dabei auf der Messbarkeit und Quantifizierbarkeit der NO – induzierten Vasodilatation. Andere Teilaspekte der Endothelfunktionen, wie z.B. Hämostase, werden hierbei außer Acht gelassen.

Zu den invasiven Verfahren zählt die intraarterielle Verabreichung von Acetylcholin, welche eine NO - vermittelte Gefäßdilatation induziert.

Acetylcholin wird im Körper von cholinergen Nerven ausgeschüttet. Im Körper hemmt es direkt die Ausschüttung von Norepinephrin aus dem sympathischen Nervensystem. Zudem stimuliert es in Gefäßen mit intaktem Endothel die Ausschüttung von Stickstoffmonoxid (NO). Dadurch kommt es zur Vasodilatation. Bei dem Vorliegen einer endothelialen Dysfunktion hingegen resultiert es in einer Vasokonstriktion (7,21,81,82). Die hierdurch induzierten Veränderungen des Blutflusses und des Gefäßdiameters kann invasiv (mittels flow wire) oder nicht invasiv (mittels hochauflösendem Ultraschall) gemessen werden.

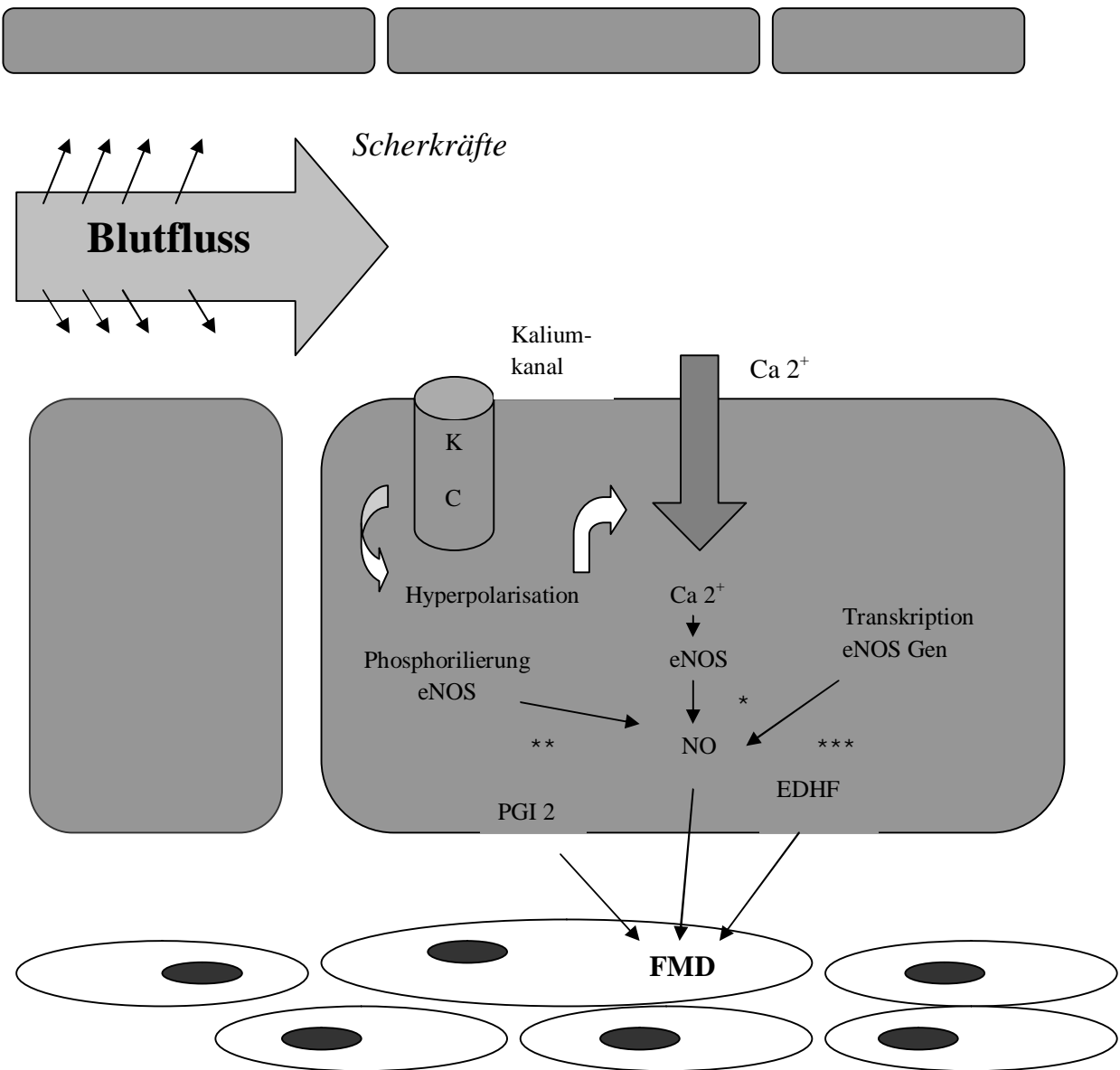
Als nichtinvasives Verfahren zählt die sogenannte Fluss-vermittelte-Dilatation. Dabei misst man mittels hochauflösendem Ultraschall die endothelabhängige Vasodilatation der Arteria brachialis nach einer vorausgegangen Ischämie des Unterarmes (49,59,62,64,71,79,83-85).

Durch die Änderung des Blutflusses und dem daraus resultierendem Shear-Stress reagiert das Endothel durch die Öffnung von calciumabhängigen Kaliumkanälen. Dadurch werden die Endothelzellen hyperpolarisiert und ermöglichen somit den verstärkten Einstrom von Calcium in die Zelle. Calcium aktiviert dann die endothelabhängige NO – Synthase (eNOS) (7,17,42,43,54,58,60,61,69,79). Somit entsteht daraus resultierend Stickstoffmonoxid und es kommt zu einer Vasodilatation (s.Abb. 8). Die Inhibition der eNOS bewirkt eine Reduktion der

brachialen FMD um 70 % (42). Durch eine kurzzeitige Erhöhung von Shear – Stress kommt es auch bei niedrigen Calciumkonzentrationen zu einer Phosphorylation von eNOS. Dies geschieht durch die Serin/Threonin Kinase und die Akt/Protein Kinase B. Durch andere posttranslationale Modifizierungen der eNOS oder Interaktionen mit Caveolin kann ebenfalls die Funktion beeinträchtigt werden. Längere Perioden von Shear – Stress aktivieren die genetische Transkription von eNOS, so dass eine kontinuierliche NO – Liberation gewährleistet ist (60).

Die flussmodulierte Vasodilatation ist ebenfalls von der NO – Inaktivierung sowie der Sensitivität der glatten Muskulatur für NO abhängig (84,86).

Abbildung 9 : Genese der FMD



Genese der FMD abhängig von verschiedenen Änderungen der Scherkräfte

* sehr kurz andauernde Veränderung

** Veränderung über Minuten

*** Veränderung über mehrere Minuten oder Stunden

Modifiziert nach : "Moens L, Goovaerts I, Claeys MJ, Vrints CJ; Flow – Mediated Vasodilatation : A Diagnostic Instrument, or an Experimental Tool ?; Chest; 2005; 127; 2254 – 2263"

Beide Verfahren werden jedoch routinemäßig nicht im klinischen Alltag zur Diagnostik angewandt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Sonographie der A. brachialis zur Feststellung der endothelialen Dysfunktion angewendet.

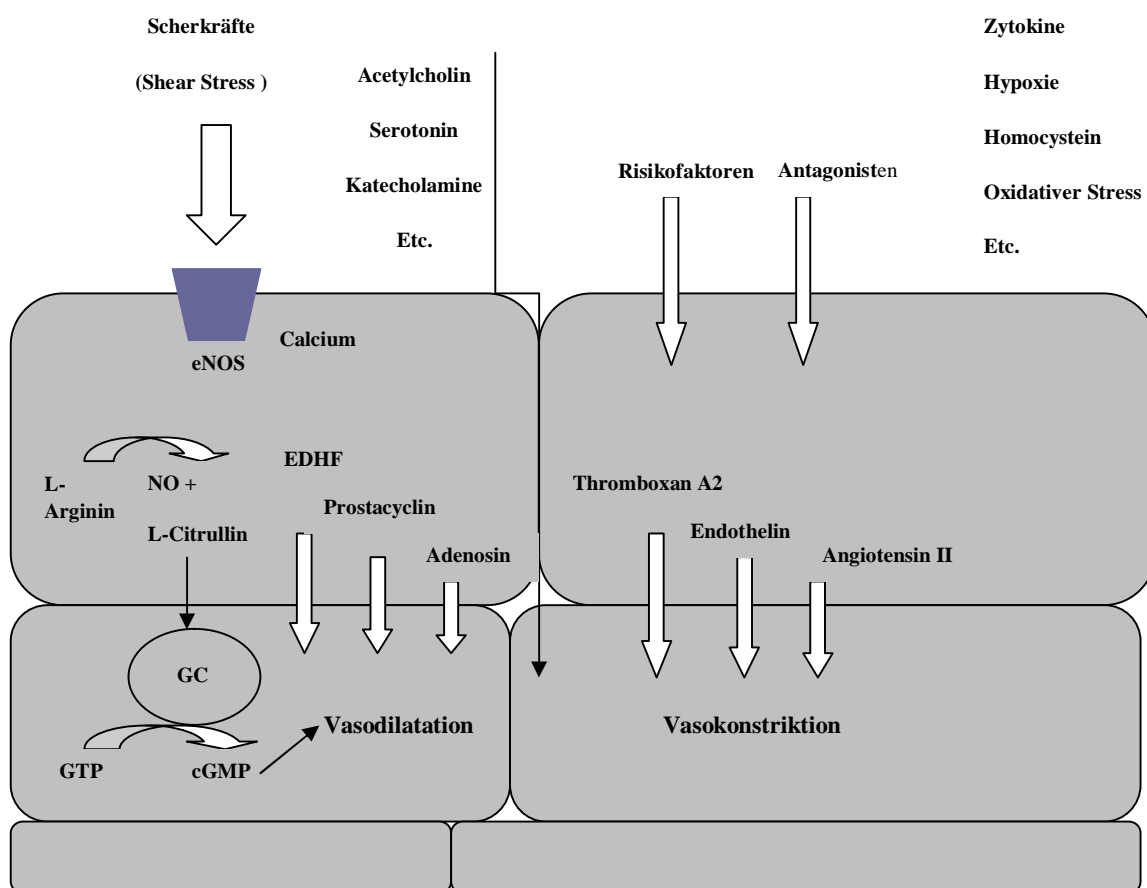
Durch zahlreiche Studien wurde belegt, dass ein Teil der endothelialen Dysfunktion durch oxidativen Stress bedingt wird (14,34,65,68,83,86,87), welcher mit fast allen traditionellen kardiovaskulären Risikofaktoren assoziiert ist. Die Reaktion von NO mit O_2^- Ionen scheint dabei am Entscheidendsten zu sein, da O_2^- - Ionen sehr effektiv die Funktionen von NO inhibieren können. Das daraus resultierende Reaktionsprodukt Peroxynitrit selbst stellt ebenfalls ein starkes Oxidans dar.

Eine mögliche Quelle des oxidativen Stresses stellt das Rauchen dar. Mentaler Stress, sowohl chronisch als auch vorübergehend, verursacht ohne Vorhandensein weiterer kardiovaskulärer Risikofaktoren eine endotheliale Dysfunktion und begünstigt somit zudem die Entstehung der Arteriosklerose. In Tierversuchen zeigte sich, dass durch chronischen Stress vermehrt Zellen geschädigt werden und somit die NO – Verfügbarkeit reduziert ist. Daraus resultierend entsteht die endotheliale Dysfunktion. Die genaue Genese in humanen Personen ist bislang noch nicht genau geklärt (87). Bei Vorliegen einer koronaren Herzerkrankung verursachte mentaler Stress durch eine sympathisch innervierte Vasokonstriktion eine Reduktion der NO – Produktion und daraus resultierend eine mögliche myocardiale Ischämie (44,87).

Unterschiedliche Studien zeigten, dass eine eingeschränkte Endothelfunktion als prognostischer Indikator für das Eintreten kardiovaskulärer Ereignisse sowie vaskulärer Veränderungen in der A. carotis (52,88,89) herangezogen werden kann (15,46,48,49,60,67-69,79,90-93). Fathi et al zeigten in einer Studie (6), dass Patienten mit einer FMD $< 2\%$ signifikant erhöhte kardiovaskuläre Ereignisse aufwiesen als Patienten mit einer normalen FMD ($> 6,3\%$). Die endotheliale Dysfunktion in einer Brachialarterie oder Poplitealarterie kann somit als Marker für eine generalisierte endotheliale Dysfunktion gewertet werden (54,61,62,69). Yeboah et al zeigten in einer Studie mit einem Follow Up von 5 Jahren, dass das Kollektiv mit einer unter dem Durchschnitt liegenden FMD ein erhöhtes Risiko für das Eintreten von kardiovaskulären Ereignissen aufwies (92). Suwaidi et al (68) zeigten ebenfalls in einer Studie mit einem Follow Up von 28 Monaten, dass Patienten mit einer bestehenden

schweren endothelialen Dysfunktion und einer koronaren Herzerkrankung ein erhöhtes Risiko für eine myokardiale Ischämie aufwiesen. Die Kollektive mit einer milden bzw. keiner Form der endothelialen Dysfunktion erlitten während des Follow Up keine Myokardinfarkte, wohingegen 14 % der Patienten mit einer schweren Form der endothelialen Dysfunktion einen Myokardinfarkt erlitten (68). In einer weiteren Studie von Perticone et al (45) wurde ebenfalls gezeigt, dass eine endotheliale Funktion prognostische Auswirkungen auf das Eintreten von kardiovaskulären Ereignissen bei Patienten mit einem arteriellen Hypertonus hat. Man kann somit sagen, dass eine eingeschränkte Endothelfunktion im Bereich der Extremitätenarterien auf die Coronarien zu übertragen ist.

Abbildung 10 : Endotheliale Funktionen



Modifiziert nach : "Tousoulis D, Antoniades C, Stefanadis; Evaluating endothelial function in humans : A guide to invasive and non-invasive techniques; Heart; 2005; 91; 553 – 558"

1.4. Einfluss des Rauchens auf die NO-Bioverfügbarkeit / Rauchen als Risikofaktor

Ein wichtiger Risikofaktor für die Arteriosklerose stellt das Rauchen dar (94-96).

Man unterscheidet beim Zigarettenrauch zwei Phasen : die Teer- und die Gasphase (97,98). Die Teerphase, die man auch als Partikelphase bezeichnet, ist der Anteil des Rauches, der z.T. durch den Filter der Zigarette gefiltert wird. Dabei werden ca. 99,9 % aller Partikel mit einer Größe von $>0,1 \mu\text{m}$ gefiltert. Die Gasphase ist definiert als der Anteil, der ungehindert den Filter passiert. Die Partikelphase enthält $>10^{17}$ freie Radikale / g (z.B. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe) (98), die Gasphase $> 10^{15}$ freie Radikale pro Zug. Die freien Radikale unterscheiden sich in ihrer Halbwertszeit. Die Radikale, die in der Partikelphase enthalten sind, sind Stunden oder Monate stabil, die Bestandteile der Gasphase hingegen nur Sekunden.

Zigarettenrauch enthält mehr als 4000 verschiedene bekannte und wohl mehr als 100.000 unbekannte Inhaltsstoffe (95,99,100). Neben toxischen (Nikotin und Kohlenmonoxid) sowie carcinogenen Substanzen wie Teer und Nitrosaminen (66) sind auch Substanzen enthalten, die die sensorischen Eigenschaften des Rauchers beeinflussen und somit die Attraktivität für die Raucher erhöhen. Dazu gehören neben Stoffen wie z.B. Vanillin auch Zusatzstoffgemische wie Pfefferminzöl oder Lakritz (101). Alleine vom Nikotin sind bislang acht tabakspezifische Derivate bekannt wie z.B. N'-Nitrosonornikotin, 4-(methylnitrosamin)-1-(3-pyridyl)-1- butanon (NNK) und 4-(methylnitrosamin)-1-(3-pyridyl)-1 butanol (NNAL). Vorgenannte gehören zu denen mit der höchsten carcinogenen Potenz (102).

Wenn der Zigarettenrauch die Alveolen der Lunge erreicht, wird das Nikotin schnell absorbiert. Dies liegt zum einen an der großen intrapulmonalen Resorptionsfläche, die durch die Verzweigung der Alveoli gewährleistet wird, zum anderen an der Auflösung des Nikotins bei einem pH-Wert von 7,4 in der Lunge. Pro Zigarette werden durchschnittlich etwa 1 mg Nikotin (0,3 – 2 mg) systemisch absorbiert. Abhängig ist die Absorption vom Volumen des Zuges, der Tiefe der Inhalation, der Anzahl der Züge sowie der Verteilung des Zigarettenrauches im Raum bzw. der Umgebung (102).

Eine weitere Einteilung des Zigarettenrauches erfolgt in Haupt- und Nebenrauch

(s.Abb. 11). Der Hauptrauch ist der Anteil, den der Raucher aktiv inhaliert (8 % Partikelphase, 92 % Gasphase) (103), der Nebenrauch ist der Anteil, der am Ende der Zigarette aufsteigt (97). Dieser enthält wesentlich mehr toxische Bestandteil als der aktiv inhalierte Teil.

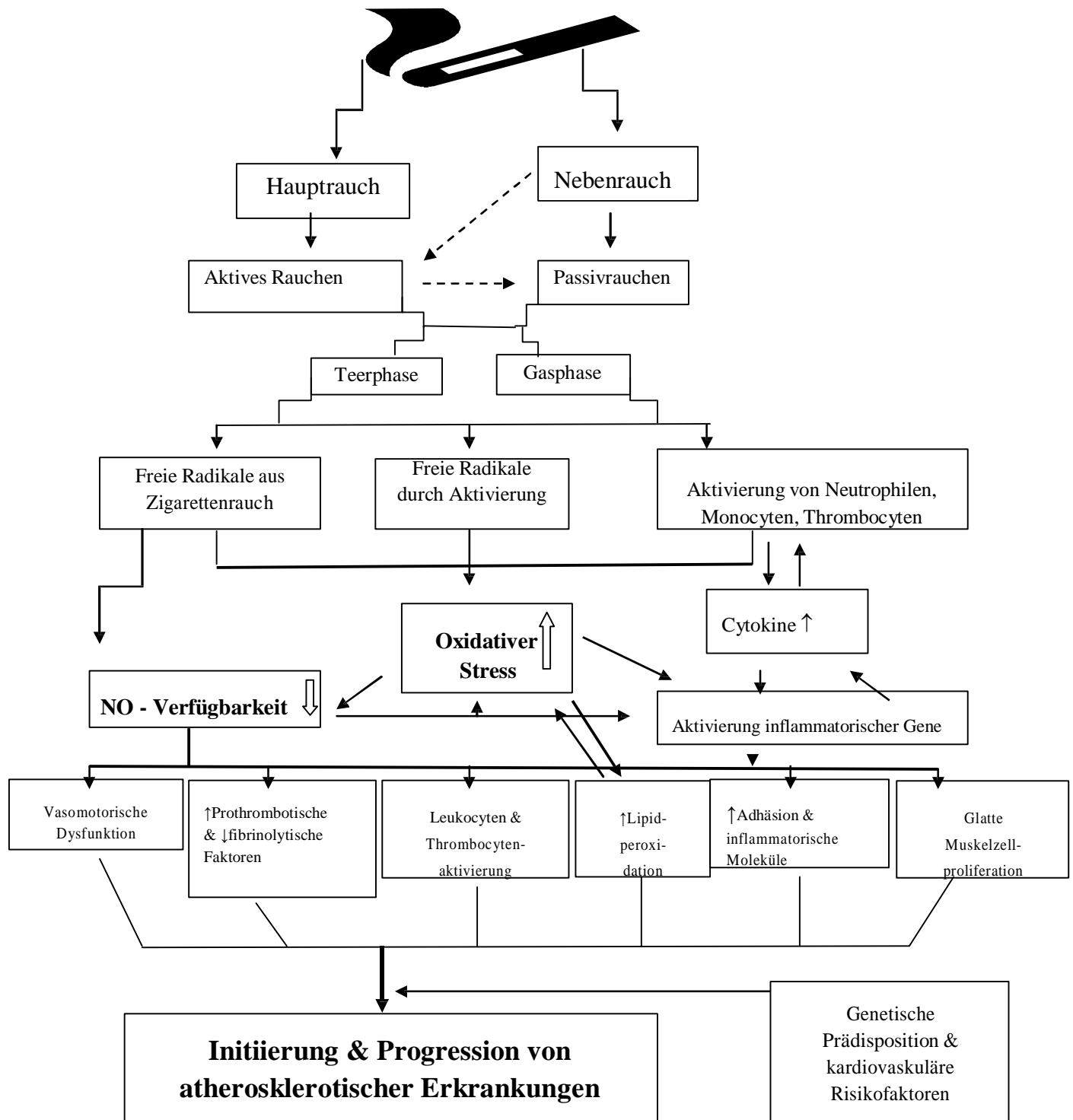
Selbst Passivrauchen mit nur einem Anteil von einem Prozent der Rauchexposition im Vergleich zu aktivem Rauchen erhöht das Risiko der koronaren Herzkrankheit um 30 %, wohingegen bei aktiven Rauchern das Risiko um 80 % ansteigt (104). Auch Jugendliche, die passiv dem Zigarettenrauch ausgesetzt sind, zeigen eine signifikant schlechtere Endothelfunktion (99).

Somit stellt Passivrauchen seit der frühen Kindheit einen zusätzlichen Risikofaktor in der Entstehung der Atherosklerose dar (104). Koronare Endothelzellen zeigten nach Inkubation mit Plasma von Rauchern niedrigere NO-Produktion als Zellen, die mit Nichtraucherplasma inkubiert wurden (104).

Somit scheint die eingeschränkte Bioverfügbarkeit von NO für diese Risikoerhöhung verantwortlich zu sein. Pathogenetisch wird oxidativer Stress (52,100,105,106,), der durch das Rauchen bedingt wird, als Hauptfaktor für die endotheliale Dysfunktion (97,100,107-109) vermutet. Über folgende Wege verursacht Rauchen oxidativen Stress :

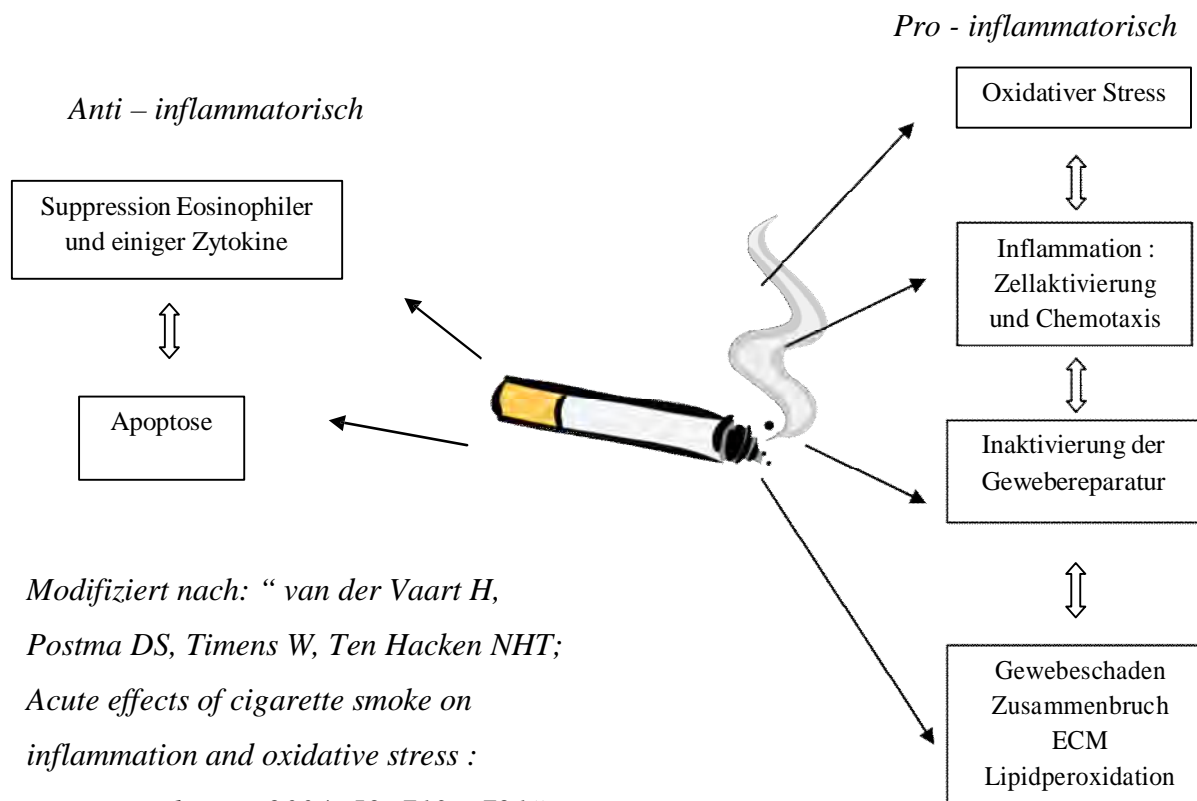
1. durch Aktivierung endogener Radikalquellen wie NOS, NADPH - Oxidase oder Xanthinoxidase (50,104)
2. durch die entzündungsfördernde Wirkung des Zigarettenrauchens (110)
3. durch reaktive Sauerstoffspezies und andere freie Radikale aus dem Zigarettenrauch (95)

Abbildung 11 : Rauchen und seine Wirkungen



Modifiziert nach : "Ambrose JA, Barua RS; The Pathophysiology of Cigarette Smoking and Cardiovascular Disease; Journal of the American College of Cardiology; 2004; Vol 43; 1731 – 1737"

Abbildung 12 : Effekte von Zigarettenrauch



Neben der direkten Reaktion von z.B. O_2^- Ionen resultiert auch die eingeschränkte Bioverfügbarkeit von Ko-Faktoren der eNOS (wie z.B. Tetrahydrobiopterin) in einer verminderten Bioverfügbarkeit von NO (37,97-100,103,106,111).

Im Serum von Rauchern zeigten sich als Ausdruck der gesteigerten Inflammation in diversen Studien wie z.B. der NHANES III (Third National Health and Nutrition Examination Survey) Erhöhungen des CRP – Spiegels (37,98,99,103,110) durch eine Stimulation der Interleukin-6 Produktion. Zudem zeigte sich bei Rauchern eine Erhöhung des Fibrinogenspiegels (37,98,103,108,110,113).

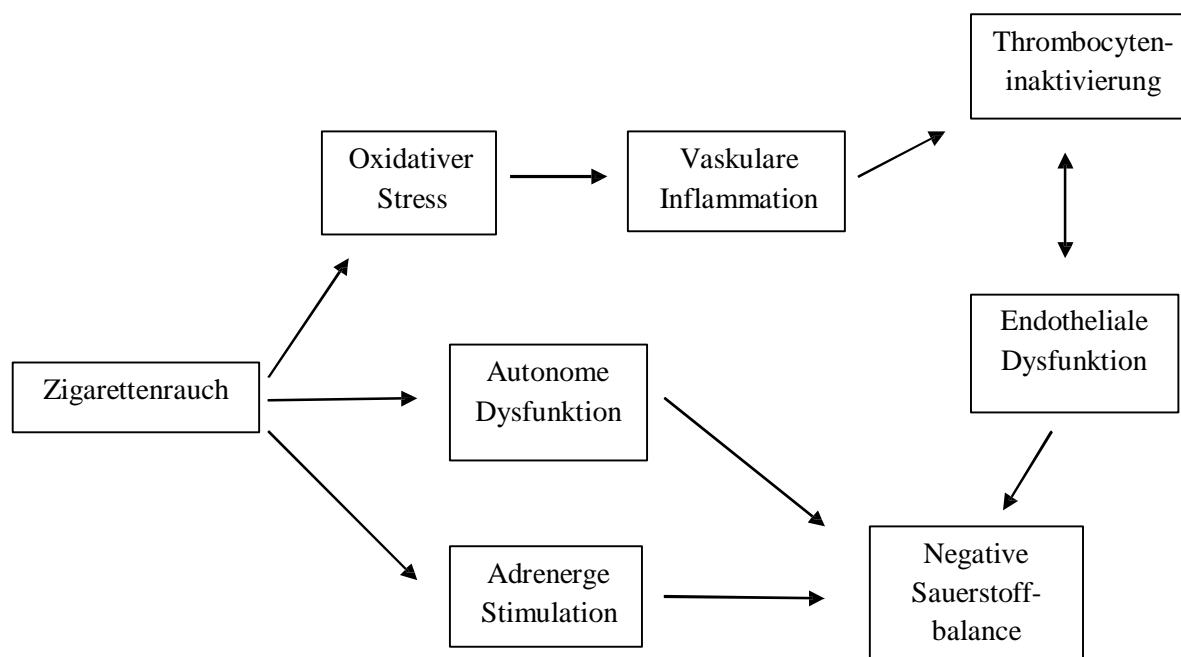
Fibrinogen selbst stellt wahrscheinlich einen Risikofaktor für die Entstehung atherosklerotischer Veränderungen dar (112), indem es u.a. die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen mit verursacht. Zudem ist es essentiell für die Thrombocytenaggregation und moduliert die Endothelfunktion (10,112,114). Durch den Tumornekrosefaktor α , der ein wichtiges pro-inflammatorisches Zytokin im Körper darstellt,

wird die Produktion anderer Zytokine, wie z.B IL-6 angeregt. Dieses wiederum regt die Bildung von akute Phase Proteinen, wie dem CRP in der Leber an. Der Tumornekrosefaktor α ist im Serum von Rauchern vermindert (99,107,113). Durch eine Stimulation der Endothelin-1 Produktion erfolgt eine Zunahme der Adhäsionsmoleküle und begünstigt die Entstehung der Atherosklerose (98). In der MONICA III North Glasgow Studie (115) zeigte sich zudem eine signifikante Korrelation zwischen dem Interleukin-6-Spiegel sowie dem Fibrinogenspiegel und der Anzahl von weißen Blutkörperchen. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Erhöhung des Fibrinogens durch eine Erhöhung bzw. Induktion von Interleukin-6 resultiert (98,110,115). Auch 10 Jahre nach der Beendigung des Rauchens zeigte sich u.a. in der MONICA Augsburg Studie eine Erhöhung des CRP – Spiegels (116). Erhöhungen des Fibrinogenspiegels äußern sich durch Auswirkungen auf die Viskosität des Blutes (Erhöhung des Hämatokritwertes), der Thrombocytenaggregation (93,105) und Fibrininformation (98). Langjährige Raucher zeigen zudem eine Erhöhung der weißen Blutkörperchen, v.a. der polymorphkernigen neutrophilen Leukocyten (PMN) (98).

Auch sind im Blut von Rauchern, verglichen mit Nichtrauchern, insgesamt die weißen Blutkörperchen (v.a. Lymphocyten und Monocyten) sowie deren Adhäsion an der Gefäßwand (103,106,108,110) erhöht. Dies spricht ebenfalls für die inflammatorische Wirkung des Rauchens bei der Entstehung der Atherosklerose.

Eine weitere systemische Wirkung des Rauchens auf den Organismus stellt die Erhöhung der Sympathikusaktivität dar (94,116-119). Dies liegt an der Wirkung des Nikotins auf die Nervenendigungen und der damit gesteigerten Freisetzung von Katecholaminen (94,120). Im Plasma von Rauchern ist der Spiegel von Norepinephrin erhöht (120). Schon nach dem Rauchen von nur zwei Zigaretten war in Untersuchungen von Narkiewicz et al sowie Groppe et al auch nach über 30 Minuten noch ein erhöhter Blutdruck sowie eine erhöhte Herzfrequenz zu verzeichnen (93,94,121). Starke Raucher zeigten zudem einen persistierend erhöhten Blutdruck sowie eine erhöhte Variabilität des Blutdruckes (121).

Abbildung 13 : Wirkungen von Zigarettenrauch auf das kardiovaskuläre System



Modifiziert nach : "Raupach T, Schäfer K, Konstantinides S, Andreas S; Secondhand smoke as an acute threat for the cardiovascular system : a change in paradigm; Eurheartj; 2006; 27; 386 – 392"

Ein weiterer Faktor, der bei Rauchern für die Entstehung der endothelialen Dysfunktion und der Atherosklerose mitverantwortlich zu sein scheint, sind die endothelialen Vorläuferzellen (EPC) (117,122). Dabei handelt es sich um Zellen, die aus dem Knochenmark ausgeschüttet werden, im Blut zirkulieren und sich bei Gefäßverletzungen u.a. in Endothelzellen oder andere Zelltypen differenzieren können (123,124). Nach Phasen einer Ischämie wie es z.B. nach einem Myokardinfarkt der Fall ist, unterstützen die endothelialen Vorläuferzellen durch ihre Differenzierung die Neovaskularisation oder Reendothelialisierung (123,125,126).

Hill et al (127) sowie Vasa et al (128) haben in Studien festgestellt, dass bei einer Zunahme der kardiovaskulären Risikofaktoren die Anzahl der endothelialen Vorläuferzellen abnimmt.

Die endothelialen Vorläuferzellen sind zudem bei Rauchern reduziert (97,108,123) . Dies liegt u.a. an der verminderten Aktivität der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) (95,123,127), die bei Rauchern reduziert ist. Dies stellt auch eine Begünstigung der Atherosklerose dar. Im Serum von Rauchern zeigten sich verminderte Vitamin C – Spiegel (98,106,110,129).

Eine Möglichkeit des Schutzes vor oxidativem Stress stellt die Applikation von Vitamin C dar. Darauf soll im folgenden Abschnitt weiter eingegangen werden.

1.5. Einfluss von Vitamin C auf die Endothelfunktion

Die Wirkung von Ascorbat (Vitamin C) und anderen Antioxidantien wie α -Tocopherol (aktive Form von Vitamin E) in Bezug auf die Entstehung und das Fortschreiten der Arteriosklerose wurde bislang in vielen Studien nachgewiesen (130). Einflüsse des Vitamin C beziehen sich zum einen auf die Oxidation von LDL (low density lipoprotein), auf die Adhäsion von Zellen sowie das vom Endothel produzierte NO (EDNO – Endothelium- derived NO) (131-134).

Vitamin C hemmt in physiologischen Dosen die LDL - Oxidation sowohl durch neutrophile Zellen als auch in zellfreiem Milieu. Dies geschieht durch die Fähigkeit des Vitamin C als Radikalfänger zu dienen (69,87,108,131,133,135-150). Durch das Wegfangen der freien Radikale im wässrigen Milieu können diese nicht mehr mit dem LDL interagieren und oxidieren (140,151). Die dabei entstandenen Ascorbylradikale werden durch chemische Reduktion, enzymatische Reduktion oder Dismutation wieder in Ascorbat verwandelt. Dadurch steht dem Organismus mehr NO zur Verfügung (151,152). Eine weitere Wirkung von Vitamin C liegt in der Hemmung der Zelladhäsion. In Studien wurde nachgewiesen, dass die von Rauchern isolierten Monocyten eine vermehrte Affinität zur Zelladhäsion mit Endothelzellen zeigten als isolierte Monocyten von Nichtrauchern. Raucher weisen damit einen geringeren Ascorbatspiegel im Blut auf (50,110,142).

Wenn ihnen exogen über mehrere Tage Vitamin C appliziert wird, zeigte sich eine Verminderung der Zelladhäsion (135,153). Man vermutet, dass durch Vitamin C die Expression von Liganden auf den Monocyten sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) (50), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1)

(131,150) und E-Selectin supprimiert wird, so dass die Interaktion mit den Leukocyten über β_1 und β_2 Integrine verbunden wird. Diese vermitteln sonst das Leukocytenrolling, die Bindung an das Endothel und das Einwandern in den subendothelialen Raum.

Eine indirekte Wirkung von Vitamin C scheint die Einsparung von intrazellularen Thiolen zu sein. Diese dienen der Stabilisierung der Freisetzung von EDNO aus S-Nitrosothiolen (152).

Teilweise sind für diese Reaktionen im menschlichen Körper insbesondere für die Beeinflussung der NO-vermittelten Vasodilatation hohe Konzentrationen an Vitamin C ($\sim 10 \text{ mmol/l}$) notwendig (141,151), wie sie meist nur kurzzeitig durch eine intravenöse Applikation zu erreichen sind (137). Padayatty et al zeigten, dass durch eine intravenöse Gabe von Vitamin C 30- bis 70- fache Wirkspiegel im Gegensatz zu einer oralen Gabe erreicht werden können (154). Heller et al sowie Huang et al haben festgestellt, dass unter Zugabe von Tetrahydrobiopterin Vitamin C auch in physiologischen Konzentrationen die Synthese durch Stimulation der eNOS (132,133,136,139,143,152) sowie die biologische Bioverfügbarkeit von NO stimuliert. Dies geschieht u.a. durch die Umwandlung von Tetrahydrobiopterin aus dem Trihydrobiopterinradikal.

Die Applikation von Vitamin C zeigte keinen Effekt auf die Endothelfunktion bei Nichtrauchern (149,154) sowie nach einer Langzeitbehandlung (146,150).

1.6. Folgende Fragestellungen werden in dieser Arbeit bearbeitet :

1. Nach welcher Zeitdauer hat die Nikotinkarenz einen Einfluss auf die Endothelfunktion bzw. der flussmedierten Vasodilatation (FMD) ?

Bislang zeigte keine zu diesem Thema durchgeführte Arbeit eine detaillierte chronologische Darstellung der Endothelfunktion bei einer größeren Probandengruppe (drei Kollektive mit jeweils 15 Probanden).

2. Welche Bedeutung haben freie Radikale bzw. deren Ausschaltung durch die antioxidative Wirkung des Vitamin C für die bei Rauchern beobachtete endotheliale Dysfunktion ? Ist bei Nikotinverzicht im Zeitverlauf eine weitere Veränderung zu verzeichnen ?

2. Material und Methoden

2.1. Studienprotokoll

Der Einfluss einer kurzfristigen Nikotinkarenz sowie die Rolle von oxidativem Stress im Rahmen der endothelialen Dysfunktion ist an drei verschiedenen Studienkollektiven untersucht worden.

Die Genehmigung des Studienprotokolls erfolgte durch die Ethikkommission der Justus Liebig-Universität-Gießen. Alle Teilnehmer der Studie wurden zunächst über die Studie aufgeklärt und erteilten dann schriftlich ihr Einverständnis. Eine Anamneseerhebung sowie eine Blutentnahme schlossen sich als nächstes an.

Der genaue Ablauf der Studie wird im Folgenden noch beschrieben.

2.2. Studienkollektiv

Das Studienkollektiv beinhaltet 45 teilnehmende Personen im Alter von 19 – 36 Jahren. Die Teilnehmer wiesen - abgesehen von den Rauchgewohnheiten bei den Rauchern - keine kardiovaskulären Risikofaktoren außer das Rauchen selbst sowie familienanamnestisch keine kardiovaskulären Erkrankungen auf. Folgende Kriterien führten zum Ausschluss aus der Studie :

Bekannte oder behandelte arterielle Hypertonie ($RR > 140/90$ mmHg)

Bekannter oder behandelter Diabetes mellitus

Bekannte oder behandelte Hyperlipoproteinämie (Cholesterin > 200 mg/dl, HDL < 45 mg/dl)

Lipoprotein(a) ≥ 30 mg/dl

Homocystein ≥ 15 mmol/l

Body-Mass-Index (BMI) > 30 kg/m²

Sonstige akute oder chronische Erkrankungen

Medikamentenallergie

Jegliche Medikamenteneinnahme

Harnsäurediathese

Verwandter ersten Grades mit prämaturner Atherosklerose (Herz- oder Hirninfarkt vor dem 50. Lebensjahr)

Alter < 18 oder > 45 Jahre

Zur Klassifizierung des Risikoprofils wurden laborchemische Parameter sowie anamnestiche Angaben herangezogen.

Das Studienkollektiv wurde in drei Gruppen mit jeweils 15 Probanden eingeteilt. Gruppe 1 und 3 beinhaltete Raucher, wobei Gruppe 1 nach der Erstuntersuchung Nikotinkarenz einhielt, Gruppe 3 ihr Rauchverhalten hingegen nicht veränderte. Gruppe 2 setzte sich aus Nichtraucher zusammen.

Als Raucher galten die Personen, die bis zum Untersuchungszeitpunkt aktive Raucher waren und täglich mindestens 10 Zigaretten über mindestens drei bis fünf Jahre geraucht hatten.

Nichtraucher waren definiert als Probanden ohne jegliche (frühere oder aktuelle) Raucheranamnese.

Gruppe 1 setzte sich aus neun Frauen und sechs Männern im Alter von 19 – 36 Jahren, Gruppe 2 aus zehn Frauen und fünf Männern im Alter von 23 – 26 Jahren und Gruppe 3 aus zwölf Frauen und drei Männern im Alter von 19 – 36 Jahren zusammen.

Sämtliche Studienteilnehmer waren freiwillige Probanden, die nach einem Aufklärungsgespräch ihre schriftliche Einverständniserklärung zur Studienteilnahme gaben.

Antropometrische und laborchemische Daten zu den unterschiedlichen Studienkollektiven sind in den Tabellen 13 bis 15 (siehe Seite 63 - 65) wiedergegeben.

2.3. Duplexsonographische Bestimmung der endothelabhängigen Dilatation der Arteria brachialis

Die funktionelle Erfassung der endothelabhängigen Vasodilatation wurde in der gängigen Literatur mittels hochauflösendem Ultraschall (> 10 MHz) quantifiziert (155,156). In unserer

Studie verwendeten wir einen Schallkopf mit einer Frequenz von 17 MHz. Die flussvermittelte Dilatation (FMD) spiegelt die Zunahme des Durchmessers der A. brachialis wieder. Diese wird durch die Stimulation der NO – Produktion durch Schubspannung ausgelöst (42,46,85).

$$\text{FMD} = \frac{D_{\text{post}} - D_{\text{prä}}}{D_{\text{prä}}} \times 100$$

basaler Diameter : D prä
nach Lösen Ischämie : D post

Die A. brachialis wird unter Ruhebedingungen am Oberarm etwa 5 – 10 cm oberhalb der Fossa antecubitalis aufgesucht (43,54,155). Der Gefäßabschnitt wird dann vergrößert und anschließend im Längsschnitt der Durchmesser ermittelt. Durch das Anlegen einer Blutdruckmanschette am Unterarm sowie den erzeugten Druckaufbau auf 200 mmHg über fünf Minuten (etwa 50 mmHg oberhalb des systolischen Blutdruckwertes (85)) erzeugte man eine reaktive Ischämie im Bereich der A. brachialis (43,157). Im Bereich der zugehörigen Leitungsarterie kam es durch die Ischämie zu einer Dilatation der Widerstandsgefäße im Endstromgebiet. Somit resultierte nach dem Lösen der Stauung ein erhöhter Blutfluss in der Leitungsarterie (43). Dadurch folgte eine Zunahme der Schubspannung im Gefäß. Dies stellt einen physiologischen Reiz für das Gefäßendothel zur Produktion von NO dar (54,79,85,156). Die Quantifizierung der NO – vermittelten Zunahme des Gefäßdurchmessers erfolgte nach Beendigung der Ischämie über drei Minuten.

Zur weiteren Charakterisierung und Beeinflussung der endothelialen Funktion durch freie Radikale applizierte man im zweiten Teil der Untersuchung 1000 mg Vitamin C i.v.. Da Vitamin C als Radikalfänger dient, kann man nach Minimierung bzw. Ausschalten der durch oxidativen Stress verursachten freien Radikale das Optimum des Gefäßendothels ermitteln (85). Der weitere Untersuchungsablauf mit Messung des Gefäßdurchmessers im Rahmen der reaktiven Hyperämie war identisch.

Der arterielle Diameter wird entweder anhand der Intima – Media – Linie oder anhand des größten Echos (M – Linie) gemessen (156). Bei unseren Untersuchungen erfolgten die Messungen anhand der M-Linien.

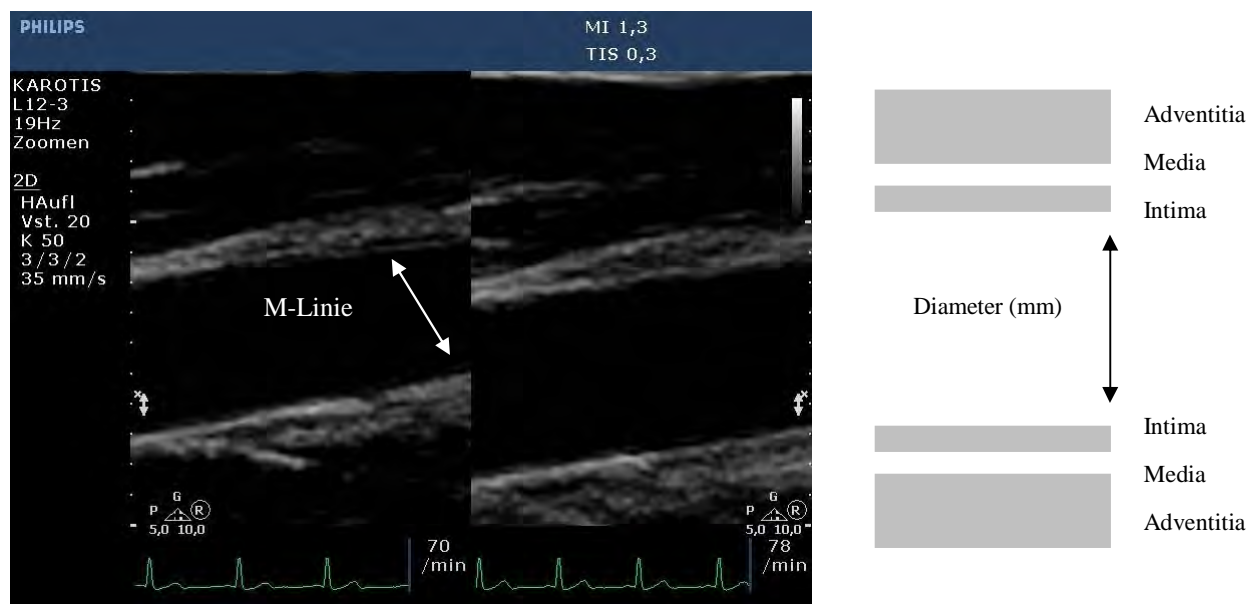
Abbildung 14 : Sonographische Darstellung der A. brachialis im Längsschnitt

Zur Erstellung der Abbildung wurde (anders als in der Studie) hier ein mit 12 MHz getackterter Linearschallkopf verwendet. Die Bezeichnung „Karotis“ im Bild bezieht sich auf ein Programm mit Voreinstellung zur optimierten Darstellung oberflächlicher Gefäßstrukturen.

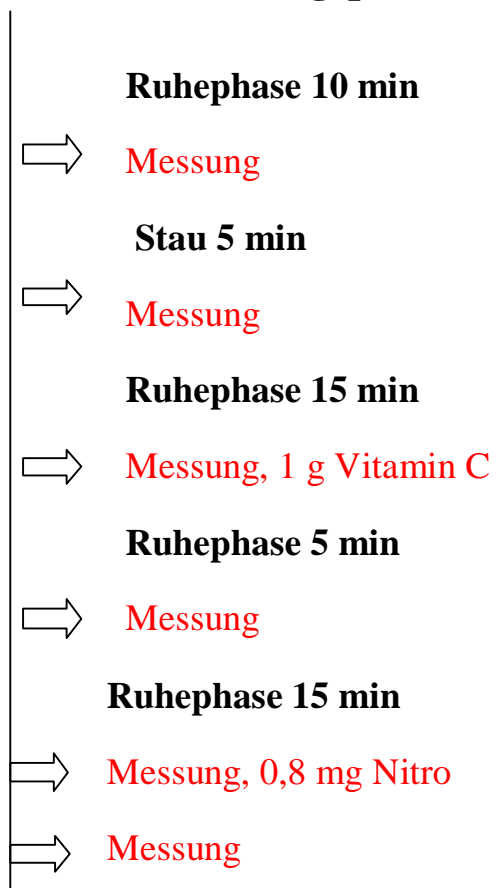


Um eine eingeschränkte FMD infolge eines vermehrten NO-Abbaus oder einem verminderten Ansprechen der glatten Muskulatur auszuschließen (54,79,152), wurde am Schluss jeder Untersuchung die endothelunabhängige Vasodilatation quantifiziert. Hierzu wurde die Zunahme des Gefäßdurchmessers der A. brachialis nach der sublingualen Applikation von 2 Hub Nitroglycerin (0,8 mg) nach zwei Minuten über die nächsten drei Minuten ermittelt.

Abbildung 15 : Sonographische Darstellung der A. brachialis vor und nach Nitroglyzerin



2.3.1. Untersuchungsprotokoll



Die Untersuchungen aller drei Gruppen erfolgte morgens. Die Probanden waren seit mindestens acht Stunden nüchtern und Probanden der Gruppe 1 & 3 rauchten eine Stunde vor Untersuchungsbeginn ihre letzte Zigarette.

Alle Messungen wurden in einem klimatisierten Raum durchgeführt. Der Untersucher war gegenüber dem Status (Raucher/Nichtraucher) geblindet.

Nach einer zehnminütigen Ruhephase des Probanden in liegender Position nach Anlage von EKG – Elektroden zur getriggerten Ultraschallmessung erfolgten

die Messung des arteriellen Blutdrucks (nichtinvasiv nach Riva Rocci) sowie eine venöse Blutentnahme über eine Butterfly-Kanüle am linken Arm. Dieser Zugang wurde anschließend mit einer 0,9 %-igen physiologischen Kochsalzlösung gespült. Anschließend erfolgte die Anlage einer Blutdruckmanschette am rechten Unterarm (Abb. 16 – 18).

Nach weiteren fünf Minuten erfolgte die Einstellung der A. brachialis am rechten Arm (inkl. Vergrößerung mittels Zoomfunktion) (Abb. 19) sowie die Markierung der Schallkopfposition am Oberarm. Während der weiteren Messungen wurden weder die Schallkopfposition noch die Geräteeinstellungen verändert. Alle Bilder wurden im DICOM-Format auf der Festplatte des Ultraschallgerätes sowie einer Datensicherungs-DVD gespeichert. Die erste Messung diente zur Darstellung des systolischen Diameters in Ruhe sowie des triphasischen Flußprofils. Anschließend wurde die Blutdruckmanschette über fünf Minuten auf 200 mmHg insuffliert. Unmittelbar nach Lösung der Stauung erfolgte eine Messung des systolischen Diameters und Dokumentation eines nunmehr monophasischen Flußes. Über die nächsten drei Minuten erfolgte alle 15 Sekunden die Akquisition einer 5-sekündigen Bildschleife mit Speicherung derselben auf der Festplatte des Ultraschallgerätes zur späteren, offline erfolgenden Messung des systolischen Diameters als Folge der reaktiven Hyperämie.

Abbildung 16 : Untersuchungslage des Probanden bei dem Experiment



Abbildung 17 : Detailaufnahme



Blutdruckmanschette am rechten Unterarm, angelegte EKG – Elektroden und venöser Zugang in der linken Cubitalvene.

Abbildung 18 : Detailaufnahme



Abbildung 19 : Detailaufnahme



Nach einer 15 - minütigen Ruhephase erfolgte die intravenöse Applikation des Radikalfängers Vitamin C (1000 mg). Der verwendete Zugang wurde anschließend mit 0,9 %-iger physiologischer Kochsalzlösung gespült.

Unmittelbar danach erfolgte wieder die Messung des systolischen Diameters in Ruhe und der Fließgeschwindigkeit. Die am rechten Unterarm lokalisierte Blutdruckmanschette wurde wieder über fünf Minuten auf 200 mmHg insuffliert. Nach dem Lösen des Staus erfolgte direkt danach die Messung des systolischen Diameters und des Flußprofils. Über die nächsten drei Minuten erfolgte alle 15 Sekunden eine Messung des systolischen Diameters.

Nach einer weiteren Ruhephase von 15 Minuten erfolgte nun die Untersuchung der endothelunabhängigen Dilatation. Nach einer weiteren Ruhemessung des systolischen Diameters und der Fließgeschwindigkeit erfolgte bei allen Probanden (RR systolisch < 110 mmHg, klinisch nicht hypotensiv) die sublinguale Applikation von 2 Hub Nitroglycerin (0,8 mg). Zwei Minuten später erfolgte über die nächsten drei Minuten alle 15 Sekunden die Messung des systolischen Diameters.

Abschließend wurde der intravenöse Zugang entfernt und eine Messung des Blutdruckes durchgeführt. Bei normotensivem Zustand wurde der Proband entlassen.

Die erneute Untersuchung erfolgte nach 23 Stunden sowie erneut nach 7 Tagen.

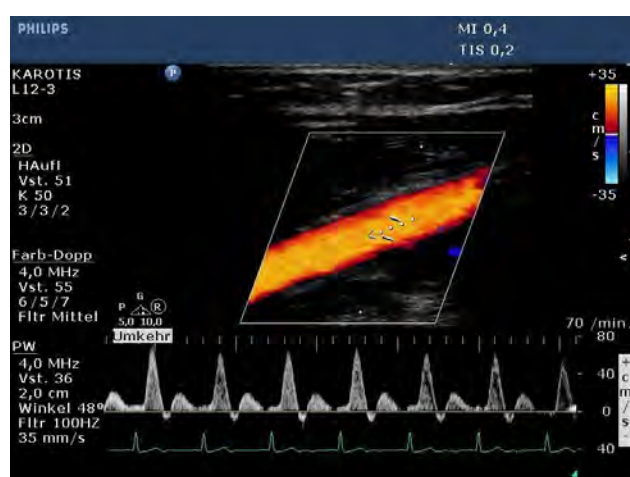
Probanden der Gruppe 1 mussten ab Tag 1 eine Nikotinkarenz einhalten, wo hingegen Probanden der Gruppe 3 weiter rauchen sollten und gebeten wurden, ihr Rauchverhalten nicht zu verändern. Eine Stunde vor der erneuten Messung sollte die letzte Zigarette geraucht werden.

2.3.2.Prinzip der sonographischen Bestimmung des arteriellen Durchmessers

Die Bestimmung des arteriellen Gefäßdurchmessers sowie der Fließgeschwindigkeit erfolgte mit einem 17 MHz Linear-Schallkopf (iU 22 Fa. Phillips) anhand von Längsschnitten der A. brachialis am Oberarm. Alle Messungen des Arteriendurchmessers erfolgten zur Eliminierung

der pulsatilen Schwankung des Gefäßdurchmessers während des Herzzyklus EKG-getriggert. Die Messungen wurden somit am Ende der Diastole (Beginn der R-Zacke) durchgeführt. Es wurden zehn Messungen pro Bild durchgeführt. Zur Orientierung bei der Messung des Gefäßdurchmessers bediente man sich der sogenannten M-Linien. Dabei handelt es sich um echoarme Linien, die den anatomischen Übergang zwischen Adventitia und Media darstellen. Vermessen wurde die Distanz zwischen der schallkopfnahen M – Linie zur schallkopffernen M – Linie rechtwinklig zur Gefäßachse.

Abbildung 20 : Duplexsonographische Darstellung der A. brachialis



Darstellung der A. brachialis mit
Dopplereinstellung sowie EKG -
Triggerung

2.4. Laborbestimmungen

2.4.1. Blutentnahme

Die Blutentnahmen erfolgten bei allen Probanden aus Cubitalvenen. Zur Punktion wurden Butterflykanülen der Firma Sarstedt verwendet, die während der Untersuchung im Probanden verblieben und mit 0,9 %-iger physiologischer NaCl – Lösung gespült wurden. Zur Entnahme des Routinelabors sowie des Blutes zur Bestimmung des Nikotin- und Kotoninspiegels verwendete man Vakuumröhrchen der Firma Sarstedt. Die Applikation des Vitamin C der Firma Rotexmedica erfolgte mittels Einmalspritze der Firma B.Braun.

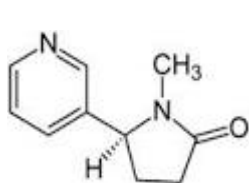
2.4.2. Bestimmung der Laborparameter

Die Bestimmung des Lipoprotein (a) erfolgte mittels Immunturbidimetrie am Analysengerät Advia der Firma Randox. Der Normalbereich für Erwachsene liegt bei < 30 mg/dl.

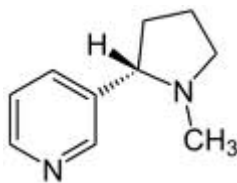
Homocystein wird über ein kompetitives Immunoassay nach dem direkten Chemilumineszenz – Verfahren mit dem Advia Centaur bestimmt.

Triglyceride, HDL – Cholesterin, LDL – Cholesterin, Cholesterin und Glucose werden mittels Photometrie mit dem Advia Chemistry Systems der Firma Bayer Health Care bestimmt.

2.4.3. Bestimmung des Kotininspiegels



(S) – Kotinin



(S) – Nikotin

Nach Hukkanen J, Jacob III P, Beowitz NL; Metabolism and Disposition Kinetics of Nicotine; Pharmacol Rev; 2005; 57; 79 -115

Nikotin wird bei aktivem und passivem Rauchen im Körper in den Hauptmetaboliten Kotinin umgewandelt. Die Halbwertszeit von Kotinin beträgt ca. 19 Stunden. Im Gegensatz zur Bestimmung der Ursprungssubstanz Nikotin hat Kotinin den Vorteil, dass exogene Kontaminationen nahezu auszuschließen sind.

Die Bestimmung des Kotininspiegels erfolgte mit 1 ml Patientenblut. Dazu gab man 3 µl des internen Standards (300 ng /ml, Nikotin – D3 / Kotinin – D3), sowie 30 µl Phosphatpuffer mit dem pH-Wert von 6. Die Extraktion erfolgte mit 1 ml Chlorobutan / Isopropanol (95:5 v:v). Anschließend wurde der Überstand abgenommen und unter Stickstoff kalt abgedampft. Die folgende Quantifizierung erfolgte mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie (Hewlett Packard). Als Säule verwendete man DB 5 MS Säule mit einer Länge von 30 m.

2.5. Statistische Verfahren

Zur Berechnung der Statistik verwendete man das Programm SAS V9.1.3 des SAS Institute, Cary, North Carolina, USA.

Tabelle 1 : Mittelwerte der unterschiedlichen Gruppen hinsichtlich der unterschiedlichen biometrischen und laborchemischen Parameter

	Raucher	Raucher mit Pause	Nichtraucher	P-Wert
Alter (Jahre)	24,73 ± 3,94	24,6 ± 4,33	24,8 ± 1,21	0,98699
Größe (m)	1,68 ± 0,07	1,74 ± 0,1	1,75 ± 0,1	0,09970
Gewicht (kg)	62,93 ± 10,2	68,2 ± 12,54	68,27 ± 12,2	0,36651
BMI (kg/m²)	22,13 ± 3,13	22,52 ± 3,05	22,03 ± 1,79	0,87517
Anzahl der täglich gerauchten Zigaretten *	12,47 ± 3,67	14 ± 4,11	0	0,28960
Zeitraum des Rauchen (Jahre) *	8,73 ± 4,37	7,6 ± 1,12	0	0,41531
Systolischer Druck (mmHg)	115 ± 3,78	116,67 ± 6,99	116,33 ± 8,76	0,77962
Diastolischer Druck (mmHg)	58 ± 5,28	62 ± 7,98	62,33 ± 4,58	0,10991
Nüchtern glukose (mg/dl)	89,07 ± 8,11	88,07 ± 7,55	85 ± 5,51	0,27778
Gesamtcholesterin (mg / dl)	169,93 ± 20,09	160 ± 17,24	160,47 ± 17,64	0,25855
HDL - Cholesterin (mg / dl)	68,4 ± 12,68	62,07 ± 11,53	62,27 ± 15,09	0,33606
LDL - Cholesterin (mg/dl)	81,87 ± 16,8	91,13 ± 10,28	94,07 ± 16,66	0,07593
Triglyceride (mg/dl)	78,33 ± 41,11	121,47 ± 62,78	93,07 ± 51,23	0,08462
Lipoprotein (a) (mg/dl)	11,53 ± 3,31	15,58 ± 6,78	18,28 ± 14,1	0,14350
Homocystein (µMol/l)	8,5 ± 1,88	8,79 ± 2,47	8,95 ± 1,24	0,81368
Kotininwert Tag 1 *	89,25 ± 75,82	111,43 ± 75,53	XXX	0,42888

Der statistische Vergleich unterschiedlicher biometrischer und biochemischer Variablen zwischen den unterschiedlichen Gruppen erfolgte für stetige (quantitative) Variablen mit einer multifaktoriellen Varianzanalyse (MANOVA) , für kategoriale (qualitative)

Merkmale mittels Chi – Quadrat Test. Die Unterschiede in der Messung der FMD in den 3 unterschiedlichen Gruppen wurden ebenfalls mittels multifaktorieller Varianzanalyse (MANOVA) verglichen. Ein p- Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. Der p-Wert bezieht sich auf die Strukturgleichheit der drei bzw. zwei Gruppen. Die p-Werte hinsichtlich der Anzahl der täglich gerauchten Zigaretten, des Zeitraums des Rauchens in Jahren sowie des Kotininspiegels (mit * versehen) beziehen sich auf die Gruppen der Raucher (Raucher und Raucher mit Pause), alle weiteren p-Werte beziehen sich auf einen Vergleich aller 3 Gruppen (Raucher, Raucher mit Pause und Nichtraucher).

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der Studienpopulation

Es wurden für diese Studie drei Studienpopulationen mit jeweils 15 Probanden untersucht. Die erste Gruppe umfasste Raucher (9 Frauen, 6 Männer), die eine Nikotinkarenz von 7 Tagen einhalten mussten, die zweite Gruppe umfasste Nichtraucher (10 Frauen, 5 Männer) und die dritte Gruppe umfasste Raucher (12 Frauen, 3 Männer), die weiterhin rauchen durften. Hinsichtlich der Ausschlusskriterien der Studie zeigt sich eine Homogenität der Studienkollektive bzgl. des Alters, des Body – Mass – Index, der systolischen und diastolischen Blutdruckwerte, des Homocysteinspiegels und der Nüchtern glukosewerte, wie es der Tabelle 1 zu entnehmen ist. Die laborchemische Bestimmung der Blutfette zeigte lediglich geringe, statistisch nicht signifikante Unterschiede.

Bei dem Studienkollektiv der Raucher und der Raucher mit Nikotinkarenz zeigte sich initial ein erhöhter Kotininspiegel und lediglich eine marginale Abweichung in Bezug auf die Packyears. Dies ist damit zu erklären, das Kotinin als Metabolit von dem aktiven Bestandteil des Zigarettenrauches Nikotin im Vergleich zu diesem eine Halbwertszeit von 19 – 20 Stunden aufweist. Die Halbwertszeit von Nikotin beträgt lediglich 2 – 4 Stunden (158). Am Tag 2 und Tag 7 wird die eingehaltene Nikotinkarenz der Gruppe 3 durch ein Absinken des Kotinspiegels deutlich, was ebenfalls in der Abbildung 25 ersichtlich wird.

Die einzelnen Werte der Kotininspiegel der unterschiedlichen Gruppen sind in den Tabellen 2 und 3 im Tabellenanhang (Seite 56-57) ersichtlich.

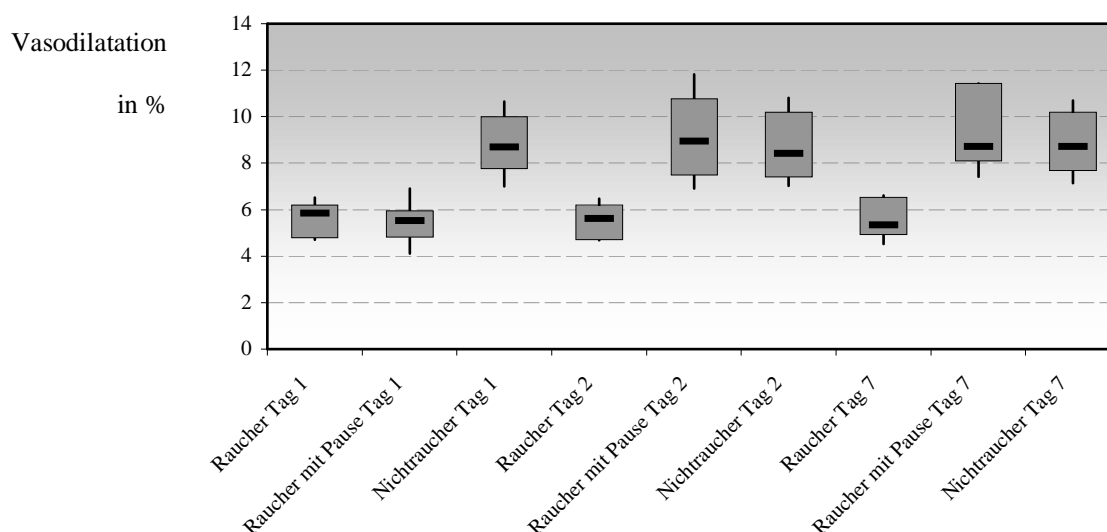
Die hierbei gefundenen Werte sind denen in der Literatur berichteten Messwerten in entsprechenden Vergleichskollektiven ähnlich (159).

3.2 Flussmodulierte Vasodilatation (nativ)

Bei der endothelabhängigen Dilatation zeigt sich bei der Gruppe der Raucher ($5,61 \pm 0,90 \%$) und der Gruppe der Raucher mit Nikotinkarenz ($5,50 \pm 1,40 \%$) bei dem Vergleich mit der Gruppe der Nichtraucher ($8,82 \pm 1,82 \%$) am Tag 1 eine deutliche Einschränkung der nativen Vasodilatation. Am Tag 2, d.h., nach einer 24 – stündigen Nikotinkarenz für eine Gruppe der Raucher zeigt sich bei dieser Gruppe der Raucher eine deutliche Zunahme der Vasodilatation auf $9,37 \pm 2,46 \%$, wohingegen die Gruppe der Raucher, die weiterhin rauchen, eine gleichbleibende reduzierte Vasodilatation ($5,60 \pm 0,87 \%$) im Vergleich zur nichtrauchenden Gruppe aufweisen ($8,91 \pm 1,82 \%$).

Dieses Ergebnis zeigt sich ebenfalls am Tag 7. Die Gruppe der Raucher mit Nikotinkarenz weisen nach 7 – tägiger Nikotinkarenz eine stabile Verbesserung der Vasodilatation ($9,28 \pm 1,86 \%$) im Vergleich zur rauchenden Gruppe ($5,57 \pm 1,05 \%$) auf. Die Nichtraucher stellen sich mit einer ebenfalls stabilen Vasodilatation ($8,92 \pm 1,78 \%$) dar. Anhand der Abbildung 21 werden die Ergebnisse bildlich verdeutlicht. Man erkennt, dass bei der rauchenden Gruppe, die eine 7 – tägige Nikotinkarenz einhalten musste, bereits nach 24 – stündiger Nikotinkarenz eine deutliche Zunahme der Vasodilatation zu verzeichnen ist, die zudem marginal über der prozentualen Vasodilatation der nichtrauchenden Gruppe liegt. Nach sieben Tagen ist keine Verbesserung der Vasodilatation bei der rauchenden Gruppe mit Nikotinkarenz mehr ersichtlich. Es zeigt sich bei dieser Gruppe lediglich ein leichter Rückgang der Vasodilatation von $0,09 \%$.

Abbildung 21 : Vasodilatation nativ



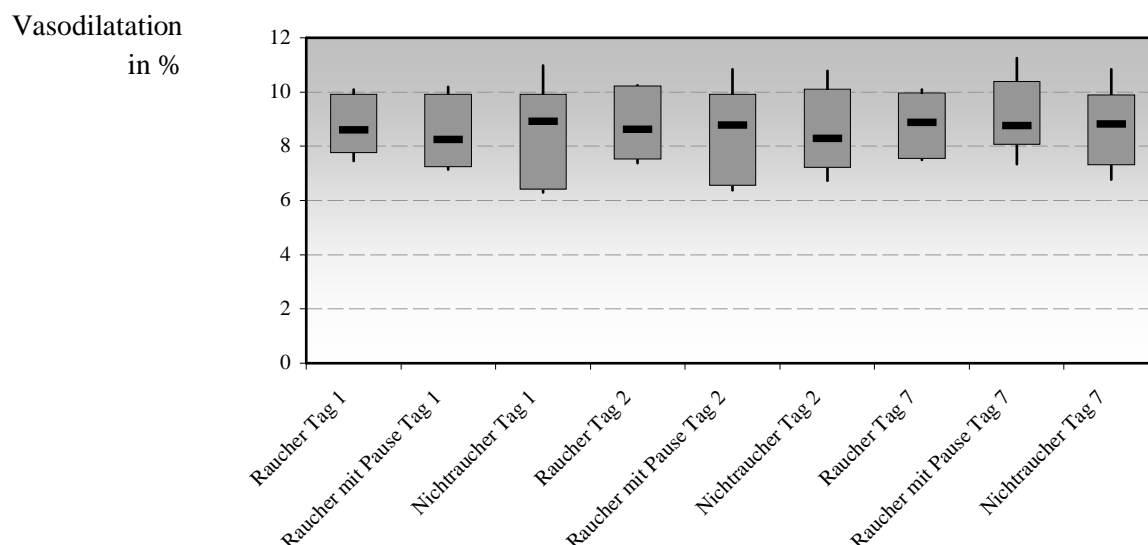
Der Boxplott stellt die native Vasodilatation der A. brachialis in Prozent des Ausgangswertes in den unterschiedlichen Probandengruppen zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten dar. Dargestellt sind die 25. bis 75. Perzentile (Box), Median (fettgedruckte Linie) und die Standardabweichungen (whisker).

Am Tag 1 zeigt sich eine deutliche Differenz zwischen der Gruppe der Nichtraucher sowie der beiden Gruppen der Raucher (p jeweils $< 0,0001$ im Gruppenvergleich). Zwischen den beiden Gruppen der Raucher zeigt sich keine Änderung (p 0,9749 im Vergleich der Gruppen). Am Tag 2 stellt sich eine deutliche Differenz ($p < 0,0001$) zwischen der Gruppe der Raucher im Vergleich zu der Gruppe der Nichtraucher und im Vergleich zu der Gruppe der Raucher mit Pause dar. Zwischen den Gruppen der Raucher mit Pause und der Nichtraucher stellt sich keine wesentliche Differenz dar (p 0,9749 im Vergleich der Gruppen). Das Gleiche zeigt sich an Tag 7 (Nichtraucher und Raucher mit Pause p 0,8124, rauchende Raucher im Vergleich zu der Gruppe der Nichtraucher und im Vergleich zu der Gruppe der Raucher mit Pause $p < 0,0001$).

3.3. Flussmodulierte Vasodilatation mit Vitamin C

Nach der intravenösen Gabe von Vitamin C zeigt sich am Tag 1 sowohl bei den Rauchern ($8,78 \pm 1,32 \%$) als auch bei den Rauchern mit folgender Nikotinkarenz ($8,67 \pm 1,53 \%$) eine Verbesserung der Vasodilatation im Vergleich zu den initialen nativen Werten. Die Gruppe der Nichtraucher zeigt bei den Tagen 1, 2 und 7 keinen relevanten Unterschied der Dilatation im Vergleich zur initialen nativen Messung. Am Tag 2 und Tag 7 zeigt sich bei der Gruppe der Raucher ohne Rauchkarenz weiterhin der positive Effekt des Vitamin C auf die Vasodilatation ($8,81 \pm 1,43 \%$ und $8,80 \pm 1,30 \%$). Bei der Gruppe der Raucher mit 24 – stündiger Nikotinkarenz zeigt sich keine weitere Verbesserung der Vasodilatation ($8,61 \pm 2,23 \%$). Nach 7 – tägiger Nikotinkarenz zeigt sich jedoch eine geringgradige, statistisch nicht signifikante Verbesserung der Vasodilatation auf $9,30 \pm 1,96 \%$ im Vergleich zu den initialen Messungen. Die Abbildung 23 zeigt ebenfalls, dass Vitamin C in der Gruppe der Nichtraucher zu keiner Verbesserung der Vasodilatation führt und in der Gruppe der Raucher zu einer durchgehenden Verbesserung der Vasodilatation führt. Die Gruppe der Raucher mit Nikotinkarenz zeigt am Tag 1 eine Verbesserung der Vasodilatation, am Tag 2 (nach 24 – stündiger Nikotinkarenz) keine weitere Verbesserung der Vasodilatation und am Tag 7 (nach 7 – tägiger Nikotinkarenz) wieder eine leichtgradige Verbesserung der Vasodilatation.

Abbildung 22 : Vasodilatation mit Vitamin C



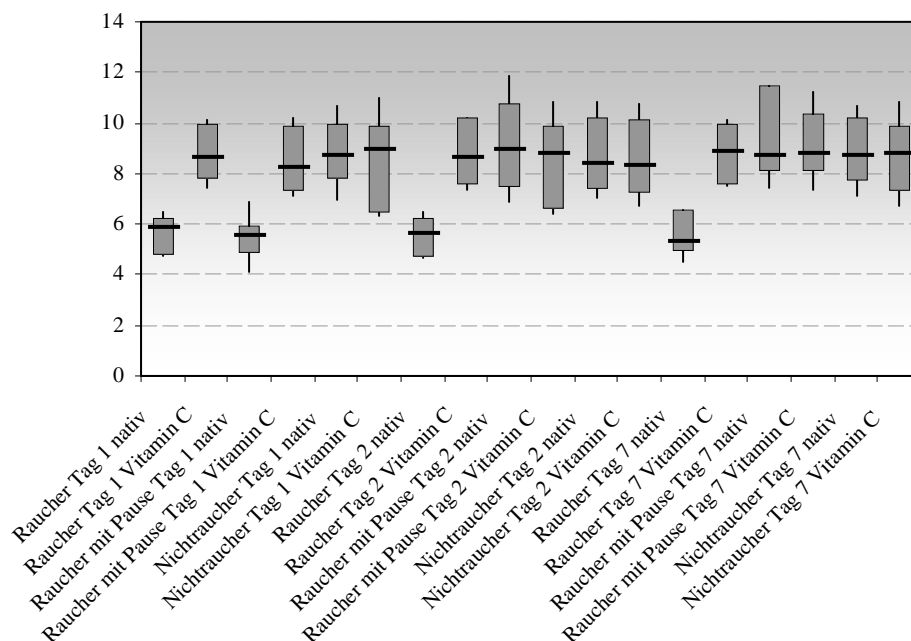
Der Boxplot stellt die Vasodilatation der A. brachialis nach der Gabe von Vitamin C in Prozent des Ausgangswertes in den unterschiedlichen Probandengruppen zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten dar. Dargestellt sind die 25. bis 75. Perzentile (Box), Median (fettgedruckte Linie) und die Standardabweichungen (whisker).

An den Tagen 1,2 und 7 ist keine relevante Änderung zwischen den 3 Gruppen zu verzeichnen (Tag 1 : Raucher im Vergleich zu Nichtrauchern p 0,9749, Raucher im Vergleich zu Rauchern mit Nikotinkarenz p 0,9824, Nichtraucher im Vergleich zu Rauchern mit Pause p 0,9993; Tag 2 : Raucher im Vergleich zu Nichtrauchern p 0,9964, Raucher im Vergleich zu Rauchern mit Nikotinkarenz p 0,9561, Nichtraucher im Vergleich zu Rauchern mit Pause p 0,9772; Tag 7 : Raucher im Vergleich zu Nichtrauchern p 1,000, Raucher im Vergleich zu Rauchern mit Nikotinkarenz p 0,7249, Nichtraucher im Vergleich zu Rauchern mit Pause p 0,7289).

Abbildung 23 : Vasodilatation mit Vitamin C an Tag 1,2 und 7 im Vergleich zur nativen Vasodilatation

Vasodilatation

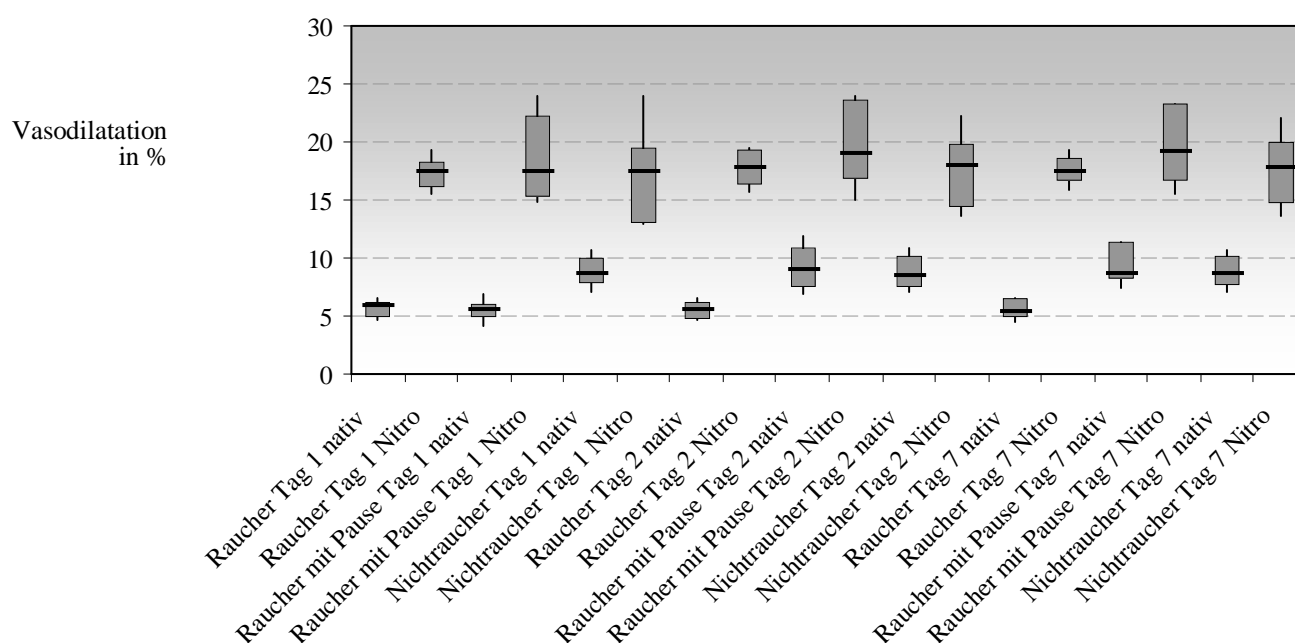
in %



3.4. Vasodilatation nach Nitroglycerin – Gabe

Bei allen drei Gruppen (Raucher, Nichtraucher und Raucher mit Nikotinkarenz) zeigt sich an den Tagen 1, 2 und 7 eine deutliche Zunahme der Vasodilatation nach der sublingualen Gabe von Nitroglycerin.

Abbildung 24 : Vasodilatation nach Nitroglycerin im Vergleich zur nativen Vasodilatation



An den Tagen 1, 2 und 7 ist keine relevante Differenz zwischen den 3 Gruppen zu sehen.

4. Diskussion

4.1. Wesentliche Ergebnisse

Die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können wie folgt zusammengefasst werden :

1. Bereits mäßiges Rauchen bewirkt eine Einschränkung der Endothelfunktion.
2. Bereits nach 24 – stündiger Nikotinkarenz zeigt sich ein signifikanter Unterschied der FMD in der Gruppe der „nichtrauchenden“ Raucher im Vergleich zu den rauchenden Rauchern, die FMD nach 24-stündiger Rauchkarenz unterscheidet sich dann nicht mehr signifikant von der Gruppe der nichtrauchenden Probanden.
3. Vitamin C bewirkt nur bei aktivem Nikotinkonsum eine Verbesserung der FMD. Dies bedeutet, dass freie Radikale bei der Entstehung der endothelialen Dysfunktion eine entscheidende Rolle spielen.

4.2. Methodenkritik

4.2.1. Messung der endothelialen Dysfunktion mit Hilfe der flussvermittelten Dilatation

Zur Quantifizierung der endothelialen Dysfunktion können zur Erfassung mehrere Untersuchungstechniken zur Hilfe genommen werden. Man unterscheidet dabei invasive (intraarterielle Gabe von Acetylcholin) von nicht – invasiven (FMD) Techniken. In der vorliegenden Arbeit wurde die endothelabhängige Dilatation mit der nicht – invasiven Technik der FMD – Messung der A. brachialis verwendet. Dabei induziert man mittels eines physikalischen Stimulus eine daraus resultierende Dilatation. Man erzeugt durch die Anlage einer Blutdruckmanschette am Unterarm sowie das Aufpumpen über fünf Minuten auf suprasystolische Werte (200 mmHg) eine Ischämie im Versorgungsgebiet der A. brachialis. Nach dem Lösen der Stauung kommt es zu einer reaktiven Hyperämie. Durch die Änderung des Blutflusses und dem damit verbundenen mechanischen Stimulus des Shear Stress (Scherkräfte) kommt es zu einer Konformitätsänderung des endothelialen Zytoskeletts. Es werden calciumabhängige Kaliumkanäle geöffnet. Dadurch werden die Endothelzellen hyperpolarisiert, so dass Calcium vermehrt in die Zelle einströmen kann. Dies führt zu einer Phosphorylierung der eNOS und bewirkt eine Steigerung der Calciumsensitivität. Daraus resultierend ist eine gesteigerte NO – Produktion, welche eine Vasodilatation der Leitungsarterien bewirkt (7,16,41,42,53,57,59,60,68,78). Diese kann sonographisch bestimmt werden (27).

Die endothelabhängige Dilatation bzw. die Genauigkeit der Quantifizierung dieser ist von mehreren Faktoren abhängig :

1. biologische Faktoren
2. untersucherseitige Variabilitäten
3. methodische Variabilitäten

Verschiedene biologische Einflussfaktoren können die endothelabhängige Dilatation beeinflussen. Neben den bekannten kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie (3-7), Diabetes mellitus (4-7), arterielle Hypertonie (4-7) etc., haben

auch weitere Einflussfaktoren eine Einschränkung der endothelabhängigen Dilatation zur Folge. Dazu gehören akuter physischer Stress (88), eine fettreiche Mahlzeit (54,73), das weibliche Geschlecht (Konzentration der weiblichen Geschlechtshormone Östrogen und Progesteron während des Menstruationszyklus) (64) sowie Zigarettenkonsum (5,6). Um die Auswirkungen der biologischen Faktoren gering zu halten, wählten wir in der vorliegenden Studie eines der Studienkollektive frei von den üblichen kardiovaskulären Risikofaktoren. Zwei der drei Gruppen wiesen jedoch einen regelmäßigen Nikotinkonsum auf.

Des Weiteren führten wir unsere Untersuchung jeweils morgens zur gleichen Tageszeit durch. Die Probanden waren seit mindestens acht Stunden nüchtern und rauchten 60 Minuten vor der Untersuchung ihre letzte Zigarette. Der Untersuchungsraum war klimatisiert und vor dem Beginn der Untersuchung wurde eine zehnminütige Ruhephase in liegender Position eingehalten. Die Messung des arteriellen Blutdruckes sowie der Herzfrequenz, welche als Parameter der sympathoadrenergen Stimulation dienen, unterschieden sich nicht signifikant vor und nach der Untersuchung. Als Einschränkung der zugrundeliegenden Studie muss man die ungleiche Geschlechterverteilung in den einzelnen Gruppen (Gruppe Raucher 12 Frauen, 3 Männer, Gruppe Raucher mit Nikotinkarenz 9 Frauen, 6 Männer, Gruppe Nichtraucher 10 Frauen, 5 Männer) sehen.

Als Hauptquellen der untersucherseitigen Variabilität sind

- 1) die technische Ausrüstung,
- 2) der Untersucher sowie
- 3) die Auswertung zu nennen.

Die Durchführung der Messungen sollten mindestens mit einem linearen Schallkopf und einer Frequenz von zumindest > 7 MHz erfolgen (46,150). Die Messungen dieser Studie erfolgten mit einem linearen Schallkopf der Firma Phillips mit einer Ultraschallfrequenz von 17 MHz. Die Untersuchung und Auswertung erfolgte von einem gut geschulten Untersucher, der diese Untersuchung bereits zuvor mehrfach durchgeführt hatte (>300 gleichartige vorherige Untersuchungen). Nur einem gut geschulten Untersucher ist es möglich, Diametermessungen von 0,1 mm zu erkennen und somit die technischen Voraussetzungen auszuschöpfen. Alle Messungen erfolgten mit den gleichen Geräteeinstellungen. Die Auswertung erfolgte nach doppelter Sicherung der Daten im DICOM – Format auf der Festplatte des Ultraschallgerätes

sowie auf einer Datensicherungs – CD.

Neben den bereits erwähnten Einflussfaktoren auf die FMD kommen ebenfalls folgende Einflussfaktoren als mögliche Quellen methodischer Variabilität in Betracht :

- 1) die Ischämiezeit,
- 2) die Größe des ischämischen Gebietes,
- 3) der zur Diametermessung herangezogene Bereich,
- 4) der Zeitpunkt der Messung nach Beendigung der Ischämie und
- 5) die Abhängigkeit vom Herzzyklus.

In vorherigen Studien wurde gezeigt, dass eine maximale Dilatation erst nach einer Ischämie von 4,5 Minuten erreicht wird. Durch eine längere Ischämiezeit kann diese nicht mehr signifikant gesteigert werden (43). Man wählte daher für die zugrundeliegende Arbeit eine für den Probanden tolerable Ischämiezeit von 5 Minuten. Bezüglich der bevorzugten Lage der Blutdruckmanschette (Ober- oder Unterarm) zur Erzeugung der Ischämie gibt es in der gängigen Literatur keinen Konsens (43,157). Corretti et al (43) sowie Tousoulis et al (54) empfahlen bzw. führten in ihren Studien jeweils die Messung mit einer Blutdruckmanschette am Unterarm durch. Bei der Durchführung einer proximalen Okklusion am Oberarm kann es zu höheren Messergebnissen der Dilatation kommen. Dies ist durch eine Anhäufung von Metaboliten, v.a. Adenosin begründet (155). Bei der Durchführung einer distalen Okklusion am Unterarm sind diese Auswirkungen auf den Gefäßabschnitt nicht erkennbar.

Des Weiteren wäre in der vorliegenden Arbeit eine direkte Kompression der A. brachialis erfolgt. Aus den eben erwähnten Gründen erfolgte daher die Okklusion distal am Unterarm. Zur Messung orientierte man sich an der sogenannten M – Linie, welche den anatomischen Übergang zwischen Adventitia und Media darstellt (43). Die Vermessung erfolgte von der schallkopfnahen M- Linie zur schallkopffernen M-Linie. Die Messung erfolgte nach dem Lösen der Ischämie alle 15 Sekunden über einen Zeitraum von drei Minuten. Die maximale Dilatation tritt in der Regel nach 60 Sekunden auf (42). Um jedoch eventuelle individuelle Unterschiede zu erfassen, erfolgte die Messung über den oben bereits erwähnten verlängerten Zeitraum.

Um bei allen Messungen die gleichen Voraussetzungen zu erlangen und da der Diameter der A. brachialis entsprechend dem Herzzyklus pulsatilen Veränderungen unterworfen ist, erfolgten die Messungen EKG – getriggert, d.h., sie wurden enddiastolisch am Ende der R – Zacke

durchgeführt. Aus jeweils zehn Messungen pro erfasstem Bild erfolgte die Berechnung eines Mittelwertes des Gefäßdiameters. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das verwendete Untersuchungsprotokoll den in den Leitlinien empfohlenen Standards entspricht (43). In der zugrundeliegenden Arbeit betrug die native Messung der FMD in den Kontrollgruppe der Nichtraucher am ersten Tag $8,82 \% \pm 1,82 \%$, am zweiten Tag $8,91 \% \pm 1,89 \%$ und am siebten Tag $8,92 \% \pm 1,78 \%$. In der Gruppe der rauchenden Raucher am ersten Tag $5,61 \% \pm 0,9 \%$, am zweiten Tag $5,60 \% \pm 0,8 \%$ und am siebten Tag $5,57 \% \pm 1,05 \%$. Die sehr niedrige Varianz der FMD in den beiden Kontrollgruppen belegt die hohe Qualität und Reproduzierbarkeit der Messungen.

Zur Beschreibung der Variabilität zwischen zwei bzw. drei Messtagen wurde für jeden Probanden die intraindividuelle Variabilität bestimmt und diese Variabilität über alle Probanden gemittelt. Die intraindividuelle Variabilität betrug zwischen zwei Messtagen im Mittel 0,18965 (Min 0,02121, Max 0,39598) und zwischen drei Messtagen im Mittel 0,19533 (Min 0,03512, Max 0,35529) als Maß, wie stark diese intraindividuelle Variabilität zwischen den Probanden schwanken kann.

Als weiteren möglichen Kritikpunkt könnte man anführen, daß Kotininbestimmungen nur bei Rauchern und nicht bei der Gruppe der Nichtraucher durchgeführt wurden. Wir halten einen hierdurch bedingten möglichen Einfluss auf die Studienergebnisse aber für vernachlässigbar, da sich die an Tag 7 der Nikotinkarenz bei den Rauchern mit Rauchpause gemessenen Werte sehr gut mit denen in der Literatur bei nicht mehr aktiven Rauchern und Nichtrauchern gemessenen Werten vergleichen lassen (159).

4.3. FMD und Nikotinkonsum

Dass Rauchen zu einer eingeschränkten Endothelfunktion führt, konnte bereits in zahlreichen Studien gezeigt werden. Barua et al (37) zeigte, dass zum einen bei Rauchern im Vergleich zu einer Kontrollgruppe von Nichtrauchern (keine arterielle Hypertonie, keine positive Familienanamnese, keine Hypercholesterinämie und kein Diabetes mellitus) die endotheliale Vasodilatation verringert ist und zum anderen Raucher weniger NO generieren. Dies lag an einer verringerten Aktivität der eNOS im Serum von Rauchern. Um dies zu beweisen, inkubierte er Serum von Rauchern und Nichtrauchern mit endothelialen Zellen aus der Nabelschnurvene.

Enderle et al (156) zeigte ebenfalls, dass Raucher eine eingeschränkte FMD aufweisen. Sein

untersuchtes Kollektiv waren gesunde Personen ohne positive Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen. Durchschnittlich wiesen seine Probanden 13,5 Packyears auf. Die FMD der Gruppe der Raucher betrug $6,9 \pm 4,4 \%$, der Nichtraucher $10,5 \pm 6,2 \%$, also durchschnittlich 3,6 % Unterschied zwischen den beiden Kollektiven, was einen signifikanten Unterschied darstellte. Die untersuchten Probanden dieser Studie wiesen zum einen $8,73 \pm 4,37$ (Gruppe der Raucher) und $7,6 \pm 1,12$ Packyears (Gruppe der Raucher mit Nikotinkarenz) auf.

Im Vergleich zu der Gruppe der Nichtraucher wiesen die beiden Gruppen der Raucher in dieser Studie eine Reduktion der endothelabhängigen Vasodilatation von durchschnittlich etwa 3,21 % trotz relativ geringer Raucheranamnese auf. Die Reversibilität der endothelialen Dysfunktion konnte ebenfalls in zahlreichen Studien belegt werden.

Ein mit der vorliegenden Arbeit nicht ganz vergleichbares Kollektiv untersuchte Raitakari et al (50). Dieser untersuchte in seiner Studie Personen im Alter von 15 – 39 Jahren, von denen eine Gruppe Nichtraucher, eine Gruppe Passivraucher und eine Gruppe frühere Passivraucher waren. Die Gruppe der Passivraucher waren bei Beginn der Studie ein Jahr lang keinem Tabakrauch mehr ausgesetzt. Raitakari belegte mit seiner Studie, dass bei den früheren Passivrauchern eine Verbesserung der endothelialen Funktion eingetreten war, die jedoch immer noch durchschnittlich 3,8 % unterhalb der Endothelfunktion der Nichtraucher lag. Moreno et al (96) zeigten, dass bei starken Rauchern (mindestens 20 py) nach einer Nikotinkarenz eine Normalisierung der bradykinininduzierten Dilatation der Handvene innerhalb von 24 Stunden erreicht wurde.

Celermajer et al (111) untersuchte in seiner Studie drei Gruppen : Nichtraucher, Raucher (durchschnittlich 16 py), frühere Raucher (durchschnittlich 13 py, seit durchschnittlich 6 Jahren kein Nikotinkonsum mehr). Im Vergleich zu der Kontrollgruppe der Nichtraucher wiesen die früheren Raucher eine eingeschränkte FMD auf, die etwas über der prozentualen FMD der Raucher lag (Nichtraucher $10 \pm 3,3 \%$, Raucher $4 \pm 3,9 \%$, frühere Raucher $5,1 \pm 4,1 \%$).

In der hiesigen Studie zeigte sich in dem Kollektiv der Raucher mit Nikotinkarenz bereits nach einer Nikotinkarenz von 24 Stunden eine Normalisierung der FMD im Vergleich zu dem Studienkollektiv der Nichtraucher. Zu diskutieren wäre, ob die Restitutio ad integrum, die sich in der hiesigen Studie zeigte, aufgrund der geringen Anzahl von Packyears ($7,6 \pm 1,12$) begründet ist und gegebenenfalls bei einer höheren Anzahl von Packyears anders ausgefallen wäre. Celermajer et al (109) sowie die Framingham Studie (71) zeigten eine inverse Relation zwischen der FMD und

dem Nikotinkonsum. Mit steigendem Nikotinkonsum, der in Packyears angegeben wird, resultiert eine Abnahme der FMD. Die in dieser Studie dargestellten Ergebnisse zeigen, dass bereits nach 24 - stündiger Nikotinkarenz eine „Erholung“ des Endothels eintritt, welche sich in einer Zunahme der FMD widerspiegelt. Zusammenfassend lässt sich, unabhängig von der prozentualen bzw. absoluten Restitutio dieses Studienkollektivs sagen, dass eine Nikotinkarenz von 24 Stunden zu einer deutlichen Verbesserung der FMD führt.

4.4. FMD und Vitamin C

In der NHANES III (Third National Health and Nutrition Examination Survey) zeigte sich, dass Raucher einen erniedrigten Vitamin-C Spiegel aufweisen. (99,110,141,152) Der Vitamin-C Spiegel weist laut Yanbaeva (99) eine inverse Beziehung zum Nikotinkonsum auf. Zahlreiche Studien setzen an dem verminderten Vitaminspiegel als Ausgangspunkt an. Dabei muss man zwischen einer oralen und intravenösen Applikationsform sowie der Applikation von mehreren Vitaminen als eine Art „Cocktail“ unterscheiden. Fennessy et al (136) zeigte an jungen, gesunden Rauchern (mindestens 2 py), dass nach einer oralen Substitution von 2 g Vitamin-C die FMD signifikant um durchschnittlich 0,12 mm zunahm. Es zeigte sich jedoch im Vergleich mit der Kontrollgruppe der Nichtraucher, die keine Substitutionstherapie erhielten, noch eine eingeschränkte FMD.

Celermajer et al (53) zeigte, dass eine kurzzeitige hohe orale Substitution bei Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung zu einer Verbesserung der endothelialen Funktion der A. brachialis führte. Inwieweit dieser Benefit auch für längerfristige Gaben zu verzeichnen ist, war nicht bekannt. Hamabe et al (139) wies mit seiner Studie ebenfalls eine Verbesserung der FMD bei Patienten mit einer Angina Pectoris Symptomatik ohne höhergradige (> 50 %) coronare Stenosen nach der Gabe von 1 g Vitamin C intravenös nach. Pellegrini et al (147) zeigten mit ihrer Studie, dass weder eine intraarterielle Vitamin C-Gabe (25 mg/min / 1 – 10 mmol/l) noch eine orale Vitamin-C Substitution von 1 g über 5 Wochen zu einer Verbesserung der Endothelfunktion oder der fibrinolytischen Funktion in jungen gesunden männlichen Rauchern führte. Tousoulis et al (151) zeigte auch, dass eine orale Monotherapie mit 2 g Vitamin C zu keiner wesentlichen Zunahme der reaktiven Hyperämie und dem damit verbundenen Blutfluss führte. Lediglich eine Kombinationstherapie mit 400 bzw. 800 IE Vitamin E führte zu einer Verbesserung.

Allen Gruppen war jedoch ein erhöhter Vitamin C Spiegel im Blut gemein. Grebe et al (138) zeigte, dass eine intravenöse Gabe von 0,5 g Vitamin C bei Patienten, die an einem obstruktiven

Schlafapnoesyndrom leiden, zu einer Verbesserung der FMD führt. In dieser Studie wurde in den ersten Minuten ein Vitamin C Plasmaspiegel von 1 mmol/l erreicht. Erst ab Plasmaspiegeln in dieser Höhe wurden nur für eine Zeitdauer von drei Minuten nach i.v. Gabe von 0,5 g Ascorbat im Experiment erreicht. Bei diesem Wert wird eine antioxidative Wirkung beschrieben. Um einen radikalfangenden Effekt des Vitamin C und eine NO – vermittelte Vasodilatation zu erreichen, sind teilweise hohe Dosen an Vitamin C notwendig (~1 – 10 mmol/l), wie es Hamabe et al (139), Pellegrini et al (147) und Jackson et al (153) zeigten. Padayatty et al (154) zeigte zudem in seiner Studie, dass trotz oraler und mehrfacher Einnahme (5 – 9 Gaben bis zu 18 g / d) von Vitamin C in Form von Früchten und Gemüse nur ein Steady State Plasmaspiegel von 80 µmol oder weniger sowie ein maximaler Peak von 220µmol/l erreicht werden kann. Aus der intravenösen Gabe von Vitamin C resultierte ein Spiegel von 15000 µmol/l.

Die für eine antioxidative Wirkung notwendigen, bereits oben erwähnten Wirkspiegel lassen sich nicht durch eine orale Gabe, selbst in hohen Dosen erreichen. In den zahlreichen Studien, die es bzgl. einer Vitamin C – Applikation und einer eventuellen Verbesserung der FMD gibt, verwendete man als Referenzgruppe gesunde Nichtraucher, wie es auch in unserer Studie geschehen ist. Heitzer et al (141) stellte fest, dass Vitamin C zwar einen Benefit bei der Gruppe der Raucher, nicht aber in der Kontrollgruppe der Nichtraucher zeigte. Gleiches wiesen Pellegrini et al (147) als auch Lykkesfeldt et al (130) nach.

Dieses Ergebnis zeigte sich auch in unserer Studie. Am Tag 1 zeigte sich in den Gruppen der Raucher, dass sie deutlich von der intravenösen Applikation von 1 g Vitamin C durch eine „Normalisierung“ der FMD im Vergleich zu der nichtrauchenden Kontrollgruppe profitierten (siehe Abbildung 23). Die Nichtraucher zeigten keine Verbesserung der FMD, sondern wiesen eine geringgradige Verschlechterung der FMD um durchschnittlich 0,18 % auf (siehe Tabelle 16). Am Tag 2 und Tag 7 sah man, dass die rauchenden Raucher weiterhin eine Verbesserung ihrer FMD zeigten, wohingegen die Raucher mit Nikotinkarenz keine weitere Verbesserung aufwiesen. Zu diskutieren wäre, ob die zugrundeliegenden Ergebnisse dieser Studie auf den geringen Nikotinkonsum der Probanden ($8,73 \pm 4,37$ und $7,6 \pm 1,12$ py) zurückzuführen sind. Vergleichende Studienkollektive wiesen größtenteils eine längere Raucheranamnese bzw. einen stärkeren Nikotinkonsum (z.B. Tousoulis et al (151) und Heitzer et al (141)) über 20 py in den Kollektiven auf.

Es lässt sich jedoch festhalten, dass in supraphysiologischen Konzentrationen von Vitamin C und einer intravenösen Applikationsform in den meisten Fällen eine Verbesserung der FMD zu

verzeichnen ist. Padayatti et al (154) zeigten, dass eine orale Aufnahme von Vitamin C nicht zu einer suffizienten Wirkung führt. Die orale Einnahme von 1,25 g Vitamin C erbrachte einen Plasmaspiegel von $134,8 \pm 20,6 \mu\text{mol/l}$, wohingegen die gleiche intravenöse Verabreichung einen Peak - Plasmaspiegel von $885 \pm 201,2 \mu\text{mol/l}$ erbrachte. D.h., dass in Anbetracht der intravenösen Applikation von 1 g Vitamin C als supraphysiologische Konzentration in unserer Studie bereits eine Verbesserung der FMD zu erwarten wäre (s. Grebe et al / 138).

4.5. Klinische Bedeutung und Ausblick

Die endotheliale Dysfunktion wird heutzutage als Vorläufer der Atherosklerose angesehen. Diese tritt häufig schon unbemerkt von klinischen Symptomen oder Einschränkungen im Kindesalter auf (54,61,62). Neben den bekannten teilweise genetisch determinierten Risikofaktoren wie Diabetes mellitus (4-7), erhöhte Homocysteinspiegel (5), Hypercholesterinämie (3-7) zählt auch das inhalative Rauchen (5,6) zu den Risikofaktoren. Heitzer et al (87) sowie Kelm et al (47) zeigten, dass eine eingeschränkte Endothelfunktion als prognostischer Indikator für das Eintreten von kardiovaskulären Ereignissen angesehen werden kann.

In der vorliegenden Arbeit verwendete man zur Feststellung der endothelialen Dysfunktion die nichtinvasive Messung der FMD (46,54). Dabei handelt es sich um eine etablierte Untersuchungsmethode.

Um die Auswirkung weiterer Risikofaktoren weitestgehend auszuschließen, schloss man in die vorliegende Arbeit Probanden ohne kardiovaskuläres Risikoprofil – außer 2 Gruppen mit Nikotinkonsum – ein.

Trotz eines geringen Nikotinkonsums der beiden Rauchergruppen und der damit verbundene Kotininspiegel zeigte sich im Vergleich zum Kollektiv der Nichtraucher bereits eine eingeschränkte Endothelfunktion. Nach 24 – stündiger Nikotinkarenz einer der Gruppen verzeichnete sich eine weitgehende Normalisierung der Endothelfunktion. Die additive intravenöse Substitution von Vitamin C erbrachte eine Verbesserung der FMD bei der Gruppe der Raucher. Bei der Gruppe der Nichtraucher sowie am Tag 2 bei der Gruppe der Raucher mit Nikotinkarenz zeigte sich keine weitere Veränderung.

Nach dem Vergleich mit anderen Studien, die die Auswirkung des Rauchens und die Wirkung

von Vitamin C auf die Endothelfunktion untersucht haben, lässt sich festhalten, dass zumindest die orale Langzeitbehandlung mit Vitamin C keinen Effekt auf die Endothelfunktion zeigt (144,148), was möglicherweise auf die durch eine orale Gabe nur in relativ niedrigem Umfang erreichbaren Vitamin-C Serumspiegel zurückzuführen ist. Eine Beendigung des Rauchens führt auch nach längjährigem Konsum zu einer Verbesserung der Endothelfunktion.

Was ist neu an der vorliegenden Studie?

1. Bislang gab es keine Daten über den Zeitverlauf der Verbesserung der FMD nach Beendigung des Rauchens.
2. Es gab keine Daten über die Gabe von Vitamin C in diesem Zusammenhang – d.h., über das „Wegfangen freier Radikale“ – was die Bedeutung des oxidativen Stresses in diesem Zusammenhang beleuchtet.
3. Erstmals wurden moderate Raucher untersucht.
4. Unterschiedlich publizierte Daten über das Ausmaß veränderter FMD in unterschiedlichen Studien können möglicherweise über unterschiedliche Länge der Nikotinkarenz erklärt werden.

5. 1. Zusammenfassung

Atherosklerotische Herz- und Gefäßerkrankungen stellen weltweit eine Haupttodesursache dar. Als initialen pathophysiologischen Prozess, der letztlich zu einem atherosklerotischen Gefäßschaden führt, sieht man heute einen Funktionsverlust der vaskulären Endothelbarriere an. In zahlreichen früheren Studien konnte gezeigt werden, dass inhalatives Rauchen zur endothelialen Dysfunktion führt und dass die Aufgabe des Rauchens zu einer Verbesserung der Endothelfunktion führt. Es existierten bislang aber praktisch keine Untersuchungen über den Zeitverlauf der Verbesserung der Endothelfunktion nach Aufgabe des Rauchens.

Die flussmedierte Vasodilatation (FMD) stellt einen anerkannten Marker der endothelialen Funktion dar. Um die endotheliale Funktion im Zeitverlauf nach Aufgabe des Rauchens zu untersuchen, haben wir die FMD der A. brachialis bei 15 gesunden Rauchern ohne weitere kardiovaskuläre Risikofaktoren vor Aufgabe des Rauchens sowie nach einer 24-stündigen und 7-tägigen Rauchpause untersucht. Als Kontrollkollektive dienten jeweils 15 Nichtraucher und

15 Raucher, die ihr Rauchverhalten nicht änderten. Die Messung der FMD der A. brachialis erfolgte mittels hochauflösendem Ultraschall (17 MHz Linear-Schallkopf eines IU22 ultrasound systems, Philips Electronics). Das Studienprogramm bestand aus einer Basisuntersuchung sowie zusätzlichen Untersuchungen 24 Stunden und 7 Tage später. Um die Bedeutung des oxidativen Stresses in diesem Zusammenhang zu untersuchen, erfolgte zu jedem dieser Zeitpunkte jeweils eine Messung der FMD vor und nach i. v. Gabe von 1 g des Radikalfängers Vitamin C. Weiterhin wurden biometrische (BMI, Blutdruck etc.) und laborchemische (Cholesterinspiegel etc.) Daten der Studienpopulation erfasst und der Spiegel an Kotinin (ein relativ stabiles Abbauprodukt des Nikotins) gemessen. Zur Bestimmung der von der Endothelfunktion unabhängigen Vasodilation erfolgte jeweils eine weitere Messung nach sublingualer Gabe von 0.8 mg Nitroglycerin.

Bei der Erstuntersuchung zeigten Raucher gegenüber Nichtrauchern eine relevant niedrigere FMD ($5,61 \pm 0,90\%$ vs. $8,82 \pm 1,82\%$, $p < 0,0001$). Nach Gabe von 1 g Vitamin C verbesserte sich bei Rauchern die FMD rapide auf das Niveau von Nichtrauchern, während sich bei Nichtrauchern keine Änderung der FMD zeigte (FMD bei Rauchern nach Vitamin C $8,78 \pm 1,32\%$ vs. $8,64 \pm 2,34\%$ bei Nichtrauchern, $p = 0,9749$). Bei den Folgeuntersuchungen 24 Stunden und 7 Tage später fanden sich in den Gruppen der Nichtraucher und den konstant weiterhin rauchenden Probanden im Vergleich zur Basisuntersuchung keine Veränderungen der FMD vor und nach Gabe von Vitamin C. Bei den Probanden, die Nikotinkarenz hielten, zeigte sich bereits nach 24-stündiger Zigarettenabstinenz eine Verbesserung der FMD auf das Level von Nichtrauchern. Eine zusätzliche Gabe von Vitamin C führte jetzt nicht mehr zu einer signifikanten Verbesserung der FMD (FMD $9,37 \pm 2,46\%$ vs. $8,61 \pm 2,23\%$ nach Gabe von Vitamin C). Eine 7-tägige Rauchkarenz führte zu keiner weiteren Veränderung der FMD in dieser Probandengruppe.

Zu keinem Zeitpunkt fanden wir wesentliche Unterschiede in der endothelunabhängigen Vasodilatation zwischen den unterschiedlichen Gruppen.

Insgesamt konnte aufgezeigt werden, dass sich bei moderaten Rauchern die endotheliale Funktion bereits nach 24-stündiger Rauchpause auf das Niveau von Nichtrauchern verbessert. Die Verbesserung der endothelialen Funktion durch Vitamin C – Gabe bei aktiven Rauchern weist auf oxidativen Stress als die Ursache der Endothelfunktionsstörung hin.

5.2 Summary

Atherosclerotic cardiovascular disease is a leading cause of death worldwide. Dysfunction of the vascular endothelial barrier is considered as an important pathophysiological process, leading to atherosclerotic vascular damage. It has been shown that smoking is associated with endothelial dysfunction and after smoking cessation endothelial function can be restored. Virtually no data exist on the time course of the recovery of endothelial function after smoking cessation. Flow mediated vasodilation (FMD) of the brachial artery is a recognised marker of endothelial function. In order to study endothelial function after smoking cessation we measured brachial artery FMD in a group of 15 smokers without other cardiovascular risk factors before, 24 hours and 7 days after smoking cessation. A group of 15 smokers who continued smoking and 15 non-smokers served as control groups.

Brachial artery FMD was measured with high-resolution ultrasound (17 MHz linear probe, IU22 ultrasound system, Philips Electronics). The study program consisted of an initial baseline examination and additional measurements 24 hours and 7 days later. At each time point a set of measurements were obtained before and after i. v. administration of 1 g of the vitamin C in order to study the effect of scavenging free radicals. Vasodilation independent of endothelial function was studied after administration of 0.8 mg nitroglycerine. Moreover biometrical and biochemical data plasma levels of cotinine were determined.

At baseline smokers showed significantly lesser FMD than non-smokers ($5,61 \pm 0,90$ % vs. $8,82 \pm 1,82$ %, $p < 0,0001$). After administration of vitamin C FMD improved significantly in smokers only and remained unchanged in non smokers. No more significant differences in FMD could be detected between the study groups (FMD in smokers $8,78 \pm 1,32$ % vs. $8,64 \pm 2,34$ % in non smokers, $p 0,9749$) 24 hours and seven days after the baseline examination FMD before and after vitamin C administration remained unchanged in smokers who continued smoking. In those who stopped smoking, FMD reached the level of non-smokers 24 hours after smoking cessation (FMD $9,37 \pm 2,46$ % vs. $8,61 \pm 2,23$ %). At this point of time no further improvement of FMD after vitamin c administration could be detected in this group. No further changes of FMD occurred 7 days after the initial examination. We did not find significant differences in endothelial-independent vasodilation between the different groups at any point of time.

at any point of time.

Endothelial function in smokers is restored completely as early as 24 hours after smoking cessation. The improvement of FMD after application of antioxidant vitamin C is in favour of oxidative stress being responsible for the endothelial dysfunction in smokers.

6. Tabellenanhang

Tabelle 2 : Kotininwerte der Raucher mit Nikotinkarenz

<i>Proband</i>	<i>Kotininwert(µg/l) Tag 1</i>	<i>Kotininwert (µg/l) Tag 2</i>	<i>Kotininwert (µg/l) Tag 7</i>
1	81,5	16,6	2,2
2	290,9	100	5,2
3	94,8	37,4	5,4
4	81,5	16,6	2,2
5	65,3	20,9	5,6
6	182,7	97,6	5
7	97,6	18,2	0
8	59,5	22,6	5,5
9	247,3	75,7	8,7
10	43,3	19,2	5,9
11	34,2	10,6	5,5
12	157,4	62,5	9,2
13	104,8	25,8	10
14	65,3	26,2	10,6
15	65,3	26,2	8,6

Tabelle 3 : Kotininwerte der Raucher

<i>Proband</i>	<i>Kotininwert (µg/l) Tag 1</i>	<i>Kotininwert(µg/l) Tag 2</i>	<i>Kotininwert(µg/l) Tag 7</i>
16	176	184,6	219,7
17	13,9	13,9	15,8
18	85,9	113,6	108
19	97,6	125,7	143,2
20	38	42,6	24,2
21	29,6	34,5	30,5
22	114,6	108,8	80,4
23	30,1	35,4	32,7

24	136,4	126	151,2
25	47,8	43,4	29,2
26	29,2	22,4	20,5
27	258,8	258,8	233,3
28	9,3	7,5	5,9
29	65,6	44,5	80
30	205,9	247,3	217,1

Tabelle 4 : Raucher mit Nikotinkarenz (nativ)

<i>Proband</i>	<i>FMD in % Tag 1</i>	<i>FMD in % Tag 2</i>	<i>FMD in % Tag 7</i>
1	8,77	10,78	10,21
2	4,10	6,98	8,92
3	3,61	5,98	6,64
4	5,77	7,45	8,07
5	5,31	14,91	12,33
6	5,97	8,93	8,40
7	5,31	8,41	8,69
8	5,71	8,02	7,42
9	6,70	12,97	11,76
10	6,88	7,04	7,75
11	5,51	9,09	9,02
12	4,80	9,25	12,31
13	5,47	12,33	11,44
14	5,75	8,55	8,21
15	2,87	9,80	8,05

Tabelle 5 : Raucher (nativ)

<i>Proband</i>	<i>FMD in % Tag 1</i>	<i>FMD in % Tag 2</i>	<i>FMD in % Tag 7</i>
16	5,63	5,60	5,21
17	6,77	6,22	6,69
18	5,98	6,13	5,87
19	4,42	4,51	4,01
20	7,00	7,03	7,41
21	4,33	4,68	4,03
22	5,21	5,33	5,11
23	6,13	6,27	6,54
24	5,21	5,41	5,33
25	6,22	6,01	6,12
26	5,83	5,99	6,10
27	4,76	4,42	4,88
28	6,61	6,69	6,81
29	5,89	5,51	5,18
30	4,21	4,13	4,26

Tabelle 6 : Nichtraucher (nativ)

<i>Proband</i>	<i>FMD in % Tag 1</i>	<i>FMD in % Tag 2</i>	<i>FMD in % Tag 7</i>
31	11,20	11,00	10,98
32	7,73	7,93	8,12
33	7,80	7,63	7,77
34	7,29	7,34	7,52
35	8,67	8,31	8,69
36	8,37	8,41	8,44
37	10,10	10,21	10,23
38	10,00	10,56	10,21

39	6,84	7,31	7,12
40	12,65	13,13	12,99
41	5,49	5,63	5,81
42	9,82	9,99	9,86
43	9,71	9,93	9,45
44	8,83	8,95	8,98
45	7,76	7,37	7,65

Tabelle 7: Raucher mit Nikotinkarenz (Vitamin C)

<i>Proband</i>	<i>FMD in % Tag 1</i>	<i>FMD in % Tag 2</i>	<i>FMD in % Tag 7</i>
1	11,12	10,32	10,39
2	7,24	6,55	7,81
3	7,27	5,38	6,23
4	7,69	7,77	7,89
5	7,08	14,14	14,07
6	9,47	9,16	8,75
7	8,93	8,78	8,99
8	8,25	8,45	8,08
9	10,63	11,07	10,88
10	9,92	6,07	8,14
11	8,13	9,09	9,81
12	7,00	7,07	12,09
13	10,96	9,92	9,81
14	9,58	9,06	8,55
15	6,73	6,36	8,06

Tabelle 8 : Raucher (Vitamin C)

<i>Proband</i>	<i>FMD in % Tag 1</i>	<i>FMD in % Tag 2</i>	<i>FMD in % Tag 7</i>
16	8,92	9,13	8,87
17	9,91	8,55	8,88
18	10,16	10,56	9,97
19	7,27	7,21	6,89
20	11,33	10,83	11,21
21	6,69	7,51	7,24
22	7,75	6,96	7,55
23	9,93	10,23	10,31
24	8,82	8,97	8,73
25	8,60	8,16	8,45
26	8,21	9,03	8,93
27	7,75	6,92	7,01
28	10,43	11,44	9,87
29	8,21	8,11	9,99
30	7,77	8,61	8,11

Tabelle 9 : Nichtraucher (Vitamin C)

<i>Proband</i>	<i>FMD in % Tag 1</i>	<i>FMD in % Tag 2</i>	<i>FMD in % Tag 7</i>
31	11,15	11,11	11,02
32	8,92	8,21	8,38
33	5,58	6,98	6,96
34	7,34	7,31	7,44
35	9,06	8,29	8,81
36	6,42	7,22	7,29
37	9,85	10,11	9,89
38	9,93	10,03	9,99
39	6,09	6,95	7,07
40	14,10	13,37	14,06

41	5,67	5,60	5,79
42	9,86	10,32	9,67
43	9,92	9,86	9,42
44	8,66	8,79	8,86
45	7,10	7,21	7,42

Tabelle 10 : Raucher mit Nikotinkarenz (Nitroglycerin)

<i>Proband</i>	<i>FMD in % Tag 1</i>	<i>FMD in % Tag 2</i>	<i>FMD in % Tag 7</i>
1	21,44	20,89	21,67
2	20,69	19,02	19,83
3	23,20	23,70	24,40
4	15,14	17,57	16,58
5	17,47	22,39	23,36
6	22,16	17,86	16,84
7	13,58	14,45	15,15
8	16,74	16,66	14,55
9	22,03	21,06	23,23
10	15,79	11,11	13,17
11	27,54	25,78	25,09
12	15,20	14,07	19,13
13	27,67	25,47	19,62
14	15,00	24,90	18,73
15	17,17	17,08	17,25

Tabelle 11 : Raucher (Nitroglycerin)

<i>Proband</i>	<i>FMD in % Tag 1</i>	<i>FMD in % Tag 2</i>	<i>FMD in % Tag 7</i>
16	15,97	16,61	16,61
17	18,34	19,32	17,37
18	21,23	19,97	20,21
19	14,75	16,21	16,11

20	17,41	17,71	19,53
21	15,73	16,98	16,87
22	19,82	19,92	18,68
23	17,51	15,97	16,61
24	18,36	19,31	17,72
25	17,53	16,66	17,51
26	16,21	17,81	17,77
27	16,98	14,59	15,93
28	20,22	19,23	18,97
29	16,45	18,81	17,21
30	15,44	14,35	14,37

Tabelle 12 : Nichtraucher (Nitroglycerin)

Proband	FMD in % Tag 1	FMD in % Tag 2	FMD in % Tag 7
31	23,91	24,10	23,97
32	19,41	19,13	19,76
33	16,93	17,21	16,93
34	12,69	14,11	14,02
35	12,86	13,21	12,96
36	19,55	20,11	19,99
37	28,90	27,83	27,21
38	12,13	14,31	14,63
39	19,15	18,31	18,10
40	20,74	19,81	20,16
41	10,22	10,71	10,06
42	17,31	16,98	17,48
43	17,36	17,97	17,68
44	17,82	17,99	17,94
45	16,42	17,14	17,80

Tabelle 13 : Biometrische und laborchemische Daten

Raucher mit Nikotinkarenz

Alter	Geschlecht	Größe/ m	BMI	Gewicht/ kg	Zigaretten/ Tag	Packyears	RRsys/ mmHg	Rrdias/ mmHg	Glu mg/dl	Chol mg/dl	HDL mg/dl	LDL mg/dl	Trigl mg/dl	LP(a) mg/dl	Hcy μMol/l
25	w	1,59	21,4	54	10	9	115	75	77	184	80	104	78	11	8,6
36	w	1,76	23,2	72	19	16	110	75	82	194	52	109	164	14	7,8
32	m	1,76	21	65	15	10	130	85	94	141	67	74	50	9,9	14,2
26	w	1,75	18,3	56	15	10	110	60	86	182	55	93	170	22	8,3
24	w	1,73	23,4	70	10	6	120	70	82	130	43	87	99	13	6,1
24	w	1,75	22,2	68	10	7	120	70	91	171	61	85	125	12	7,6
23	m	1,8	23,1	75	12	5	110	60	78	134	56	78	52	29	6,3
21	m	1,91	17,8	65	11	6	110	75	91	166	53	113	160	10	8,3
25	w	1,72	23,7	70	16	6	110	70	95	142	62	80	63	6	7,5
23	m	1,81	30,5	100	20	8	130	80	81	189	48	141	275	24	13,4
19	w	1,64	21,2	57	12	5	115	70	83	169	72	97	121	21	7,6
24	m	1,75	26,1	80	20	10	120	80	103	148	49	99	82	9,9	8,3
20	w	1,58	20,8	52	10	5	110	65	88	186	69	117	203	9,9	6,2
24	m	1,85	23,4	80	10	5	120	80	95	162	77	85	90	21	10,8
23	w	1,65	21,7	59	20	6	120	65	95	162	77	85	90	21	10,8

BMI

Body Mass Index

RR sys mmHg

Systolischer Blutdruckwert in mmHg

RR dias mmHg

Diastolischer Blutdruckwert in mmHg

Glu mg/dl

Blutzuckerwert in mg/dl

Chol mg/dl

Cholesterin in mg/dl

HDL mg/dl

High – density – Lipoprotein in mg/dl

LDL mg/dl

Low – density – Lipoprotein in mg/dl

Trigl mgdl

Triglyceride in mg/dl

LP (a) mg/dl

Lipoprotein (a) in mg/dl

Hcy μmol/l

Homocystein in μmol/l

Tabelle 14 : Biometrische und laborchemische Daten

Nichtraucher

Alter	Geschlecht	Größe/ m	BMI	Gewicht/ kg	Zigaretten/ Tag	Packyears	RRsys/ mmHg	Rrdias/ mmHg	Glu mg/dl	Chol mg/dl	HDL mg/dl	LDL mg/dl	Trigl mg/dl	LP(a) mg/dl	Hcy μMol/l
24	w	1,58	20,8	52	0	0	110	60	85	145	57	78	54	9,9	8,8
23	m	1,88	23,2	82	0	0	115	65	96	175	64	111	47	9,9	8,4
26	m	1,84	23,3	79	0	0	100	60	78	169	46	123	66	9,9	10,1
24	w	1,71	21,2	62	0	0	120	70	85	230	74	156	123	9,9	8,6
26	w	1,65	21,7	59	0	0	120	80	77	182	52	130	254	6,1	9,5
27	w	1,67	21,9	61	0	0	125	80	88	156	63	93	59	9,9	7,5
24	m	1,88	24	85	0	0	110	65	84	168	48	120	114	22	9,5
26	m	1,92	23,9	88	0	0	130	75	90	169	82	87	69	29	9,7
25	w	1,69	23,5	67	0	0	105	70	79	217	76	141	130	9,9	8,6
25	w	1,66	20	55	0	0	120	65	86	165	51	114	88	9,9	7,5
25	w	1,72	21,6	64	0	0	115	80	83	117	66	51	82	9,9	8,9
24	m	1,87	24,3	85	0	0	125	75	83	154	49	105	82	29	7,3
23	w	1,76	17,5	54	0	0	125	80	87	146	44	82	66	14	8,4
26	w	1,69	21,7	62	0	0	120	70	80	192	65	105	100	12	8,1
24	w	1,75	21,9	67	0	0	105	60	94	179	97	82	62	28	12,3

Tabelle 15 : Biometrische und labormetrische Daten

Raucher ohne Nikotinkarenz

Alter	Geschlecht	Größe/ m	BMI	Gewicht/ kg	Zigaretten/ Tag	Packyears	RRsys/ mmHg	Rrdias/ mmHg	Glu mg/dl	Chol mg/dl	HDL mg/dl	LDL mg/dl	Trigl mg/dl	LP(a) mg/dl	Hcy μMol/l
29	m	1,72	20,3	60	10	13	110	70	90	205	55	113	127	13	10,7
26	w	1,72	19,3	57	12	8	110	65	92	158	89	50	57	13	8,2
25	w	1,63	27,9	74	15	4	110	65	89	175	70	78	121	9,9	7,3
24	w	1,68	18,4	52	15	7	115	60	95	160	57	87	46	9,9	7,8
26	w	1,68	29,4	83	10	13	115	55	92	181	83	86	73	17	8,3
25	m	1,84	23,6	80	10	5	120	60	89	153	55	75	84	21	8,2
23	m	1,72	23,7	70	10	5	115	55	83	158	66	72	64	9,9	7,7
19	w	1,63	23,3	62	10	4	120	55	96	189	74	98	11	9,9	10,4
23	w	1,65	22	60	20	10	120	55	68	145	72	64	57	9,9	6,6
22	w	1,7	20,1	58	10	6	115	50	99	149	47	88	81	9,9	5,6
21	w	1,75	20,2	62	10	7	115	60	99	162	84	68	66	9,9	8,4
25	w	1,64	20,4	55	20	12	120	55	82	148	61	73	59	9,9	10,7
25	w	1,63	21,8	58	10	10	110	55	92	199	64	111	185	9,9	7,7
22	w	1,73	22,4	67	10	7	115	55	80	169	64	79	91	9,9	7,1
36	w	1,55	19,1	46	15	20	115	55	90	198	85	86	53	9,9	12,8

Abbildung 25 : Mittelwerte der Kotininspiegel

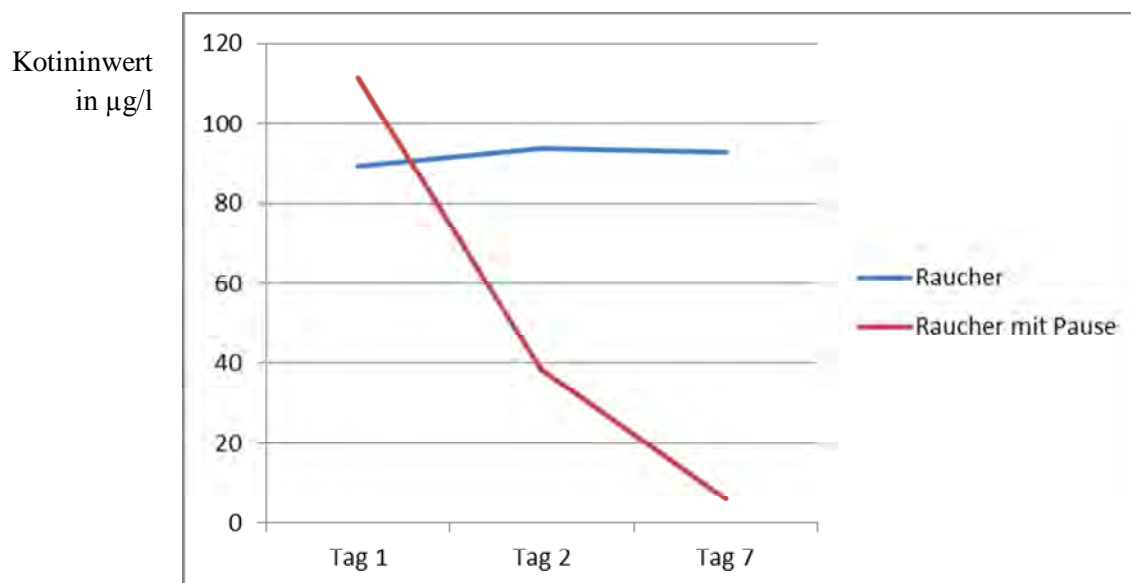


Tabelle 16 : Ergebnisse der FMD (Angabe der Mittelwerte)

	Raucher	Raucher mit Pause	Nichtraucher
Vasodilatation (%) Tag 1	5,61 ± 0,90	5,50 ± 1,40	8,82 ± 1,82
Vasodilatation (%) Tag 2	5,60 ± 0,87	9,37 ± 2,46	8,91 ± 1,89
Vasodilatation (%) Tag 7	5,57 ± 1,05	9,28 ± 1,86	8,92 ± 1,78
Vasodilatation (%) + Vitamin C Tag 1	8,78 ± 1,32	8,67 ± 1,53	8,64 ± 2,34
Vasodilatation (%) + Vitamin C Tag 2	8,81 ± 1,43	8,61 ± 2,23	8,76 ± 2,03
Vasodilatation (%) + Vitamin C Tag 7	8,80 ± 1,30	9,30 ± 1,96	8,80 ± 2,04
Vasodilatation (%) + Nitroglycerin Tag 1	17,46 ± 1,86	19,39 ± 4,53	17,69 ± 4,78
Vasodilatation (%) + Nitroglycerin Tag 2	17,56 ± 1,84	19,47 ± 4,48	17,93 ± 4,23
Vasodilatation (%) + Nitroglycerin Tag 7	17,43 ± 1,50	19,24 ± 3,71	17,91 ± 4,22

7. Literaturverzeichnis

1. WHO Fact sheet No 317; 09.2009
2. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ. Atherosclerosis : Basic Mechanisms. *Circulation*. 1995; 91; 2488-2496
3. Hansson GK. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *New England Journal of Medicine*. 2005; 352; 1685-1695
4. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation*. 2002; 105; 1135-1143
5. Ross R. Atherosclerosis – An Inflammatory Disease. *New England Journal of Medicine*. 1999; 340; 115-126
6. Drexler H. Factors Involved in the Maintenance of Endothelial Function. *American Journal of Cardiology*. 1998; 82; 3S-4S
7. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial Function and Dysfunction. *Circulation*. 2007; 115; 1285-1295
8. Mathur KS, Kumar V, Kashyap SK. The Natural History of Coronary Atherosclerosis. *Chest*. 1964; 46; 70-77
9. Schwarzacher SP. Das Endothel : parakrine und endokrine Funktionen. *Journal für Kardiologie*. 2002; 9; 121-124
10. Stocker R, Keaney JF. New Insights on Oxidative Stress in the Artery Wall. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2005; 3; 1825-1834
11. Yeh ETH. CRP as a Mediator of Disease. *Circulation*. 2004; 109; II-1-II-14
12. Witztum JL, Steinberg D. Role of Oxidized Low Density Lipoprotein in Atherogenesis. *Journal of Clinical Investigation*. 1991; 88; 1785-1792
13. Berliner JA, Watson AD. A Role for Oxidized Phospholipids in Atherosclerosis. *New England Journal of Medicine*. 2005; 353;1
14. Laursen JB, Somers M, Kurz S, Mc Cann L, Warnholtz A, Freemann BA, Tarpey M, Fukui T, Harrison DG. Endothelial Regulation of Vasomotion in ApoE-Deficient Mice : Implications for Interactions between Peroxynitrite an Tetrahydrobiopterin. *Circulation*. 2001; 103; 1282-1288
15. Widlansky ME, Gokce N, Keaney Jr JF, Vita JA. The Clinical Implications of Endothelial

- Dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003; 42; 1149-1160
16. Furchgott RF, Zawadzki JV. The Obligatory Role of Endothelial Cells in the Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Acetylcholine. *Nature*. 1980; 288; 373-376
 17. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-Derived Relaxing and Contracting Factors. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1989; 3; 2007-2018
 18. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric Oxide Release Accounts for the Biological Activity of Endothelium-Derived Relaxing Factor. *Nature*. 1987; 327; 524-526
 19. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-Derived Relaxing Factor Produced and Released from Artery and Vein is Nitric Oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1987; 84; 9265-9269
 20. Kelm M, Feelisch M, Spahr, Piper HM, Noack E, Schrader J. Quantitative and Kinetic Characterization of Nitric Oxide and EDRF Released from Cultured Endothelial Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1988; 154; 236-244
 21. Diodati JG, Dakak N, Gilligan DM, Quyyumi AA. Effect of Atherosclerosis on Endothelium-Dependent Inhibition of Platelet Activation in Humans. *Circulation*. 1998; 98; 17-24
 22. Trochu JN, Bouhour JB, Kaley G, Hintze TH. The Role of Endothelium-Derived Nitric Oxide in the Regulation of Cardiac Oxygen Metabolism : Implications in Health and Disease. *Circulation*. 2000; 87; 1108-1117
 23. Förstermann U, Münzel T. Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease / From Marvel to Menace. *Circulation*. 2006; 113; 1708-1714
 24. Palmer RMJ, Ashton DS, Monaca S. Vascular Endothelial Cells Synthesize Nitric Oxide from L-Arginine. *Nature*. 1998; 333; 664-666
 25. Flemming I, Busse R. Molecular Mechanisms Involved in the Regulation of the Endothelial Nitric Oxide Synthase. *American Journal of Physiology*. 2003; 284; R1-R12
 26. Leone AM, Palmer RMJ, Knowles RG, Francis PL, Ashton DS, Monaca S. Constitutive and Inducible Nitric Oxide Synthases Incorporate Molecular Oxygen into Both Nitric Oxide and Citrulline. *Journal of Biological Chemistry*. 1991; 266; 23790-23795
 27. Kelm M, Schrader J. Control of Coronary Vascular Tone by Nitric Oxide. *Circulation Research*. 1990; 66; 1561-1575

28. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by HMG-CoA Reductase Inhibitors. *Circulation*. 1998; 97; 1129-1135
29. Rassaf T, Preik M, Kleinbongard P, Lauer T, Heiß C, Strauer BE, Feelisch M, Kelm M. Evidence for In Vivo Transport of Bioactive Nitric Oxide in Human Plasma. *Journal of Clinical Investigation*. 2002; 109; 1241-1248
30. Wang X, Tanus-Santos JE, Reiter CD, Dejam A, Shiva S, Smith RD, Hogg N, Galdwin MT. Biological Activity of Nitric Oxide in the Plasmatic Compartment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004; 101; 31; 11477-11482
31. Rassaf T, Kleinbongard P, Preik M, Dejam A, Gharini P, Lauer T, Erckenbrecht J, Duschin A, Schulz R, Heusch G, Feelisch M, Kelm M. Plasma Nitrothiols Contribute to the Systemic Vasodilator Effects of Intravenously Applied NO. *Experimental and Clinical Study on the Fate of NO in Human Blood. Circulation Research*. 2002; 91; 6; 470-477
32. Scorza G, Pietraforte D, Minetti M. Role of Ascorbate and Protein Thiols in the Release of Nitric Oxide from S-Nitroso-Albumin and S-Nitroso-Glutathione in Human Plasma. *Free Radical Biology and Medicine*. 1996; 22; 4; 633-642
33. Traverse JH, Wang YL, Du R, Nelson D, Lindstrom P, Archer SL, Gong G, Bache RJ. Coronary Nitric Oxide Production in Response to Exercise and Endothelium-Dependent Agonists. *Circulation*. 2000; 101; 2526-2531
34. Cai H, Harrison DG. Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases : the Role of Oxidant Stress. *Circulation Research*. 2000; 87; 840-844
35. Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and Reactive Oxygen Species : Pathophysiological Importance in Atherosclerosis, Hypertension, Diabetes and Heart Failure. *Cardiovascular Research*. 1999; 43; 562-571
36. Sies H. Oxidative Stress : Oxidants and Antioxidants. *Experimental Physiology*. 1997; 82; 291-295
37. Barua RS, Ambrose JA, Eales-Reynolds LJ, De Voe MC, Zervas JG, Saha DC. Dysfunctional Endothelial Nitric Oxide Biosynthesis on Healthy Smokers with Impaired Endothelium-Dependent Vasodilatation. *Circulation*. 2001; 104; 1905-1910
38. Rassaf T, Bryan NS, Kelm M, Feelisch M. Concomitant Presence of N-Nitroso and S-Nitroso Proteins in Human Plasma. *Free Radical Biology & Medicine*. 2002; 3; 1590-1596
39. Stamler JS, Jaraki O, Osborne J, Simon DI, Keanry J, Vita J, Singel D, Valeri CR, Loscalzo

- J. Nitric Oxide Circulates in Mammalian Plasma Primarily as an S-Nitroso Adduct of Serum Albumin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992; 89; 7647-7677
40. Stamler JS. S-Nitrothiols in the Blood – Roles, Amounts, and Methods of Analysis. *Circulation Research*. 2004; 94; 414-417
 41. Feelisch M, Rassaf T, Mnaimneh S, Singh N, Bryan NS, Jourdain D, Kelm M. Concomitant S-, N-, and Heme-Nitros(yl)ation in Biological Tissues and Fluids : Implications for the Fate of NO In Vivo. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2002; 16; 1775-1785
 42. Vogel RA. Measurement of Endothelial Function by Brachial Artery Flow-Mediated Vasodilatation. *American Journal of Cardiology*. 2001; 88; 31E-34E
 43. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herington D, Vallance P, Vita J , Vogel R. Guidelines for the Ultrasound Assessment of the Endothelial-Dependent Flow-Mediated Vasodilatation of the Brachial Artery. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002; 39; 257-265
 44. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic Impact of Coronary Vasodilator Dysfunction on Adverse Long-Term Outcome of Coronary Heart Disease. *Circulation*. 2000; 101; 1899-1906
 45. Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafa A, Ferraro A, Chello M, Mastroiusto P, Verdecchia P, Schillaci G. Prognostic Significance of Endothelial Dysfunction in Hypertensive Patients. *Circulation*. 2001; 104; 191-196
 46. Anderson TJ. Prognostic Significance of Brachial Flow-Mediated Vasodilation. *Circulation*. 2007; 115; 2372-2375
 47. Kelm M, Strauer BE. Endotheliale Dysfunktion – Therapeutische und prognostische Relevanz. *Internist*. 1999; 40; 1300-1307
 48. Goligorsky MS. Endothelial Cell Dysfunction : Can't Live With It, How to Live Without It. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2005; 288; 871-880
 49. Davignon J, Ganz P. Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. *Circulation*. 2004; 109; III-27-III32
 50. Raitakari OT, Adams MR, McCredie RJ, Griffiths KA, Celermajer DS. Arterial Endothelial Dysfunction Related to Passive Smoking is Potentially Reversible in Healthy Young

- Adults. *Annals of Internal Medicine*. 1999; 130; 578-581
51. Lavi S, Prasad A, Yang EH, Mathew V, Simari RD, Rihal CS, Lerman LO, Lerman A. Smoking Is Associated With Epicardial Coronary Endothelial Dysfunction and Elevated White Blood Cell Count in Patients With Chest Pain and Early Coronary Artery Disease. *Circulation*. 2007; 115; 2621-2627
 52. Juonala M, Viikari JSA, Laitinen T, Marniemi J, Helenius H, Rönkämaa T, Raitikari O. Interrelations between Brachial Endothelial Function and Carotid Intima-Media Thickness In Young Adults. *Circulation*. 2004; 10; 2918-2923
 53. Celermajer DS. Endothelial Dysfunction : Does it Matter ? Is it Reversible ? *Journal of the American College of Cardiology*. 1997; 30; 325-333
 54. Tousoulis D, Antoniades C, Stefanadis C. Evaluating Endothelial Function in Humans : a Guide to Invasive and Non-Invasive Techniques. *Heart*. 2005; 91; 553-558
 55. Antoniades C, Tousoulis D, Tountas C, Tentlouris C, Totouza M, Vasiliadou C, Tsioufis C, Toutouzas P, Stefanadis C. Vascular Endothelium and Inflammatory Process, in Patients with Combined Type 2 Diabetes Mellitus and Coronary Atherosclerosis : the Effects of Vitamin C. *Diabetic Medicine*. 2004; 21; 552-558
 56. Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial Dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2004; 15; 1983-1992
 57. Kawano H, Motoyama T, Hirashima O, Hirai N, Miyao Y, Sakamoto T, Kugiyama K, Ogawa H, Yasue H. Hyperglycemia Rapidly Suppresses Flow-Mediated Endothelium-Dependent Vasodilatation of Brachial Artery. *Journal of the American College of Cardiology*. 1999; 34; 146-154
 58. Perticone F, Ceravolo R, Candigliota M, Ventura G, Iacopino S, Sinopoli F, Mattioli PL. Obesity and Fat Distribution Induce Endothelial Dysfunction by Oxidative Stress – Protective Effects of Vitamin C. *Diabetes*. 2001; 50; 159-165
 59. Verma S, Buchanan MR, Anderson TJ. Endothelial Function Testing as a Biomarker of Vascular Disease. *Circulation*. 2003; 108; 2054-2059
 60. Moens AL, Goovaerts I, Claeys MJ, Vrints CJ. Flow-Mediated Vasodilation – A Diagnostic Instrument, or an Experimental Tool ? *Chest*. 2005; 127; 2254-2263
 61. Ganz P, Vita JA. Testing Endothelial Vasomotor Function : Nitric Oxide, a Multipotent Molecule. *Circulation*. 2003; 108; 2049-2053

62. Celermajer DS. Statins, Skin, and the Search for a Test of Endothelial Function. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003; 42; 78-80
63. Chan NN, Colhoun HM, Vallance P. Cardiovascular Risk Factors as Determinants of Endothelium-Dependent and Endothelium-Independent Vascular Reactivity in the General Population. *Journal of the American College of Cardiology*. 2001; 38; 1814-1820
64. Hashimoto M, Akishita M, Eto M, Ishikawa M, Kozaki K, Toba K, Sagara Y, Taketani Y, Orimo H, Ouchi Y. Modulation of Endothelium-Dependent Flow-Mediated Dilatation of the Brachial Artery by Sex and Menstrual Cycle. *Circulation*. 1995; 92; 3431-3435
65. Hornig B, Maier V, Drexler H. Physical Training Improves Endothelial Function in Patients with Chronic Heart Failure. *Circulation*. 1996; 93; 210-214
66. Papamichael C, Karatzis E, Karatzi K, Aznaouridis K, Papaioannou T, Protogerou A, Stamatelopoulos K, Zampelas A, Lekakis J, Mavrikakis M. Red Wine's Antioxidants Counteract Acute Endothelial Dysfunction Caused by Cigarette Smoking in Healthy Nonsmokers. *American Heart Journal*. 2004; 147; G1-G5
67. Wassmann S, Laufs S, Stamenkovic D, Linz W, Stasch JP, Ahlbory K, Röse R, Böhm M, Nickenig G. Raloxifene Improves Endothelial Dysfunction in Hypertension by Reduced Oxidative Stress and Enhanced Nitric Oxide Production. *Circulation*. 2002; 105; 2083-2091
68. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes Jr DR, Lerman A. Long-Term Follow-Up of Patients with Mild Coronary Artery Disease and Endothelial Dysfunction. *Circulation*. 2000; 101; 948-954
69. Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial Function : A Critical Determinant in Atherosclerosis. *Circulation*. 2004; 109; 27-33
70. Kannel WB, Dawber TR, Kagan A, Revotskie N, Stokes J. Factors of Risk in the Development of Coronary Heart-Disease – Six Year Follow - Up Experience / The Framingham Study. *Annals of Internal Medicine*. 1961; 55; 1; 33-50
71. Benjamin EJ, Larson MG, Keyes MJ, Mitchell GF, Vasan RS, Keaney JF, Lehman BT, Fan S, Osypiuk E, Vita JA. Clinical Correlates and Heritability of Flow-Mediated Dilatation in the Community – The Framingham Heart Study. *Circulation*. 2004; 109; 613-619
72. Assmann G, Schulte H. The Prospective Cardiovascular Münster (PROCAM) Study: Prevalence of Hyperlipidemia in Persons with Hypertension and/or Diabetes Mellitus and the Relationship to Coronary Heart Disease. *American Heart Journal*. 1988; 116; 1713-1724

73. Willerson JT, Kereiakes DJ. Endothelial Dysfunction. *Circulation*. 2003; 108; 2060-2061
74. Khera A, de Lemos JA, Peshock RM, Lo HD, Stanek HG, Murphy SA, Wians Jr FH, Grundy SM, Mc Guire DK. Relationship Between C-Reactive Protein and Subclinical Atherosclerosis : The Dallas Heart Study. *Circulation*. 2006; 113 38-43
75. Paul A, Ko KWS, Li L, Yeohor V, Mc Crory MA, Szalai AJ, Chan L. C-Reactive Protein Accelerates the Progression of Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Circulation*. 2004; 109; 647-655
76. Wilson PWF; Nam BH, Pencina M, D'Agostino RB, Benjamin EJ, O'Donnell CJ. C-Reactive Protein and Risk of Cardiovascular Disease in Men and Women from the Framingham Heart Study. *Archiv of Internal Medicine*. 2005; 165; 2473-2478
77. Meyer R. CRP-Spiegel korrelieren mit Atherosklerose. *Deutsches Ärzteblatt*. 2002; 99; 17
78. Vogel RA, Correti MC, Plotnick GD. Effect of a Single High-Fat Meal on Endothelial Function in Healthy Subjects. *American Journal of Cardiology*. 1997; 79; 350-354
79. Lieberman EH, Gerhard MD, Uehata A, Selwyn AP, Ganz P, Yeung AC, Craeger MA. Flow Induced Vasodilation of the Human Brachial Artery is Impaired in Patients < 40 Years of Age with Coronary Artery Disease. *American Journal of Cardiology*. 1996; 78; 1210-1214
80. Bots ML, Westerink J, Rabelink TJ, de Koning EJP, Assessment of Flow-Mediated Vasodilation (FMD) of the Brachial Artery : Effects of Technical Aspects of the FMD Measurement on the FMD Response. *European Heart Journal*. 2005; 26; 363-368
81. Katz SD, Schwarz M, Yuen J, Le Jemtel TH. Impaired Acetylcholine-Mediated Vasodilation in Patients with Congestive Heart Failure. Role of Endothelium-Derived Vasodilating and Vasoconstricting Factors. *Circulation*. 1993; 88; 55-61
82. Hirooka Y, Imaizumi T, Tagawa T, Shiramoto M, Endo T, Ando S, Takeshita A. Effects of L-Arginine on Impaired Acetylcholine-Induced and Ischemic Vasodilation of the Forearm in Patients with Heart Failure. *Circulation*. 1994; 90; 658-668
83. Preik M, Lauer T, Heiss C, Tabery S, Strauer BE, Kelm M. Automated Ultrasonic Measurement of Human Arteries for the Determination of Endothelial Function. *Ultraschall in der Medizin*. 2000; 21; 195-198
84. Nightingale AK, James PP, Morris-Thurgood J, Harrold F, Tong R, Jackson SK, Crockcroft JR, Frenneaux MP. Evidence against Oxidative Stress as a Mechanism of Endothelial

- Dysfunction in Methionine Loading Model. *American Journal of Physiology-Heart and Circulation Physiology*. 2001; 280; 1334-1339
85. Kuvin JT, Karas RH, Clinical Utility of Endothelial Function Testing – Ready for Prime Time ? *Circulation*. 2003; 107; 3243-3247
 86. Adams MR, Ribinson J, McCredie R, Seale JP, Sorensen KE, Deanfield JE, Celermajer DS. Smooth Muscle Dysfunction Occurs Independently of Impaired Endothelium-Dependent Dilation in Adults at Risk of Atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 1998; 32; 123-127
 87. Heitzer T, Schlinzing T, Krohn K, Meinertz T, Münzl T. Endothelial Dysfunction, Oxidative Stress, and Risk of Cardiovascular Events in Patients with Coronary Artery Disease. *Circulation*. 2001; 104; 2673-2678
 88. Ghiadoni L, Donald AE, Cropley M, Mullen MJ, Oakley G, Tylor M, O'Connor G, Betteridge J, Klein N, Steptoe A, Deanfield JE. Mental Stress Induces Transient Endothelial Dysfunction in Humans. *Circulation*. 2000; 102; 2473-2478
 89. Sorensen KE, Kristensen IB, Celermajer DS. Atherosclerosis in the Human Brachial Artery. *Journal of the American College of Cardiology*. 1997; 29; 318-322
 90. Järvisalo MJ, Raitakari M, Toikka JO, Putto-Laurila A, Rontu R, Laine S, Lehtimäki T, Rönnemaa T, Viikari J, Raitakari OT. Endothelial Dysfunction and Increased Arterial Intima-Media Thickness in Children with Type 1 Diabetes. *Circulation*. 2004; 109; 1750-1755
 91. Perrone-Filardi P, Cuocolo A, Brevetti G, Silvestro A, Storto G, Dellegrottaglie S, Corrado L, Cafiero M, Camerino R, Polimento M, Zarrilli A, Caiazzo G, Maglione A, Petretta A, Chiariello M. Relation of Brachial Artery Flow-Mediated Vasodilation to Significant Coronary Artery Disease in Patients With Peripheral Arterial Disease. *American Journal of Cardiology*. 2005; 96; 9; 1337-1341
 92. Yeboah J, Crouse JR, Hsu FC, Burke GL, Herrington DM. Brachial Flow-Mediated Dilation Predicts Incident Cardiovascular Events in Older Adults : The Cardiovascular Health Study. *Circulation*. 2007; 115; 2390-2397
 93. Angerer P, Negut C, Störk S, von Schacky C. Endothelial Function of the Popliteal Artery in Patients with Coronary Artery Disease. *Atherosclerosis*. 2001; 155; 187-193
 94. Narkiewicz K, van de Borne PJH, Hausberg M, Cooley RL, Winniford MD, Davison DE,

- Somers VK. Cigarette Smoking Increases Sympathetic Outflow in Humans. *Circulation*. 1998; 98; 528-534
95. Ijzerman RG, Serne EH, van Weissenbruch MM, de Jongh RT, Stehouwer CDA. Cigarette Smoking is Associated with an Acute Impairment of Microvascular Function in Humans. *Clinical Science*. 2003; 104; 247-252
 96. Moreno Jr H, Chalon S, Urae A, Tangphao O, Abiose AK, Hoffman BB, Blaschke TF. Endothelial Dysfunction in Human Hand Veins is Rapidly Reversible after Smoking Cessation. *American Journal of Physiology*. 1998; 275; H1040-H1045
 97. Smith CJ, Fischer TH. Particulate and Vapor Phase Constituents of Cigarette Mainstream Smoke and Risk of Myocardial Infarction. *Atherosclerosis*. 2001; 158; 257-267
 98. Raupach T, Schäfer , Konstantinides S, Andreas S. Secondhand Smoke as an Acute Threat for the Cardiovascular System : a Change in Paradigm. *European Heart Journal*. 2006; 27; 386-392
 99. Yanbaeva DG, Dentener A, Creutzberg EC, Wesseling G, Wouters EFM. Systemic Effects of Smoking. *Chest*. 2007; 131; 1557-1566
 100. Kallio K, Jokinen E, Raitakari OT, Hämäläinen M, Siltala M, Volanen I, Kaitossaari T, Vikikari J, Rönnemaa T, Simell O. Tobacco Smoke Exposure is Associated With Attenuated Endothelial Function in 11-Year-Old Healthy Children. *Circulation*. 2007; 115; 3205-3212
 101. Benowitz NL, Peng M, Jacob III P. Effects of Cigarette Smoking and Carbon Monoxide on Chlorzoxazone and Caffeine Metabolism. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2003; 74; 468-474
 102. Merckel C, Pragst R. Tabakzusatzstoffe in Zigaretten – Verwendungszweck und Gefahrenpotential. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*. 2007; 2; 287-301
 103. Hukkanen J, Jacob III P, Benowitz NL. Metabolism and Disposition Kinetics of Nicotine. *Pharmacological Reviews*. 2005; 57; 79-115
 104. Ambrose JA, Barua RS. The Pathophysiology of Cigarette Smoking and Cardiovascular Disease – An Update. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004; 43; 1731-1737
 105. Barua RS, Ambrose JA, Srivastava S, De Voe MC, Eales-Reynolds LJ. Reactive Oxygen Species Are Involved in Smoking-Induced Dysfunction of Nitric Oxide Biosynthesis and

- Upregulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Circulation*. 2003; 107; 2341-2347
106. Kaufmann PA, Gnechi-Ruscone T, di Terlizzi M, Schäfers KP, Lüscher TF, Camici PG. Coronary Heart Disease in Smokers : Vitamin C Restores Coronary Microcirculatory Function. *Circulation*. 2000; 102; 1233-1238
 107. van der Vaart H, Postma DS, Timens W, Ten Hacken NH. Acute Effects of Cigarette Smoke on Inflammation and Oxidative Stress : A Review. *Thorax*. 2004; 54; 712-721
 108. Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, Numaguchi Y, Kobayashi K, Iino S, Inden Y, Murohara T. Smoking Cessation Rapidly Increases Circulation Progenitor Cells in Peripheral Blood in Chronic Smokers. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2004; 24; 1442-1447
 109. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelthaler DJ, Miller OI, Sullivan ID, Lloyd JK, Deanfield JE. Cigarette Smoking is Associated with Dose-Related and Potentially Reversible Impairment of Endothelium-Dependent Dilation in Healthy Young Adults. *Circulation*. 1993; 88; 2149-2155
 110. Srivastava S, Barua RS, Saha DC, Eales-Reynolds LJ, De Voie MC. Endogenous Free Radical Generating Sources are Involved in Smoking-Mediated Dysfunction of Nitric Oxide Biosynthesis in Human Coronary Artery Endothelial Cells : An In Vitro Demonstration. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003; 41; 306
 111. Adams MR, Jessup W, Celermajer D. Cigarette Smoking is Associated with Increases Human Monocyte Adhesion to Endothelial Cells : Reversibility with Oral L-Arginin but not Vitamin C. *Journal of the American College of Cardiology*. 1997; 29; 491-497
 112. Grebe MT, Luu B, Sedding D, Heidt MC, Kemkes-Matthes B, Schaefer CA, Tillmanns HH, Gündüz D. Fibrinogen Promotes Early Atherosclerotic Changes of the Carotid Artery in Young, Healthy Adults. *Journal of the Atherosclerosis and Thrombosis*. 2010; 27; 1003-1008
 113. Koenig W. Fibrin(ogen) in Cardiovascular Disease : An Update. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2003; 89; 601-609
 114. Bazzano LA, He J, Muntner P, Vupputuri S, Whelton PK. Relationship between Cigarette Smoking and Novel Risk Factors for Cardiovascular Disease in the United States. *Annals of Internal Medicine*. 2003; 138; 891-897
 115. Welsh P, Woodward M, Rumley A, Lowe G. Associations of Plasma Pro-Inflammatory

- Cytokines, Fibrinogen, Viscosity and C-Reactive Protein With Cardiovascular Risk Factors and Social Deprivation : the Fourth Glasgow MONICA Study. *British Journal of Haematology*. 2008; 141; 852-861
116. Woodward M, Rumley A, Tunstall-Pedoe H, Lowe GDO. Associations of Blood Rheology and Interleukin-6 with Cardiovascular Risk Factors and Prevalent Cardiovascular Disease. *British Journal of Haematology*. 1999; 104; 246-257
 117. Peters M, Fröhlich M, Döring A, Immervoll T, Wichmann HE, Hutchinson WL, Pepys MB, Koenig W. Particulate Air Pollution is Associated with an Acute Phase Response in Men – Results from the MONICA Augsburg Study. *European Heart Journal*. 2001; 22; 1198-1204
 118. Celermajer DS, Ng MKC. Where There's Smoke. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008; 51; 1760-1771
 119. Fulton JE, Shekelle RB. Cigarette Smoking, Weight Gain, and Coronary Mortality – Results from the Chicago Western Electric Study. *Circulation*. 1997; 96; 1438-1444
 120. Jenkins CD, Rosenman RH, Zyzanski SJ. Cigarette Smoking : Its Relationship to Coronary Heart Disease and Related Risk Factors in The Western Collaborative Group Study. *Circulation*. 1968; 38; 1140-1155
 121. Grassi G, Seravalle G, Calhoun DA, Bolla GB, Giannattasio C, Marabini M, Del Bo A, Mancia G. Mechanisms Responsible for Sympathetic Activation by Cigarette Smoking in Humans. *Circulation*. 1994; 90; 248-253
 122. Groppelli A, Giorgi DMA, Omboni S, Parati G, Mancia G. Persistent Blood Pressure Increase Induced by Heavy Smoking. *Journal of Hypertension*. 1992; 10; 495-499
 123. Schmidt-Lucke C, Rössig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kämper U, Dimmeler S, Zeiher AM. Reduced Number of Endothelial Progenitor Cells Predicts Future Cardiovascular Events – Proof of Concept for the Clinical Importance of Endogenous Vascular Repair. *Circulation*. 2005; 111; 2981-2987
 124. Kanaganayagam G, Marber MS. Editorial Comment – ADMAring Endothelial Progenitor Cells : Accident, Association, or Antecedent. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005; 46; 1702-1704
 125. Wang XX, Zhu JH, Chen JZ, Shang YP. Effects of Nicotine on the Number and Activity of Circulating Endothelial Progenitor Cells. *Journal of Clinical Pharmacology*. 2004; 44;

881-889

126. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial Progenitor Cells – Characterization and Role in Vascular Biology. *Circulation Research*. 2004; 95; 343-353
127. Hill JM, Zalos G, Halcox JPJ, Schenke WH, Wacławski MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating Endothelial Progenitor Cells, Vascular Function, and Cardiovascular Risk. *New England Journal of Medicine*. 2003; 348; 593-600
128. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and Migratory Activity of Circulating Endothelial Progenitor Cells Inversely Correlate with Risk Factors for Coronary Artery Disease. *Circulation Research*. 2001; 89; E1-E7
129. Thum T, Tsikas D, Stein S, Schultheiss M, Eigenthaler M, Anker SD, Poole-Wilson PA, Bauersachs J. Suppression of Endothelial Progenitor Cells in Human Coronary Artery Disease by the Endogenous Nitric Oxide Synthase Inhibitor Asymmetric Dimethylarginine. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005; 46; 1693-1701
130. Lykkesfeldt J, Christen S, Wallock LM, Chang HH, Jacob RA, Ames BN. Ascorbate is Depleted by Smoking and Repleted by Moderate Supplementation : A Study in Male Smokers and Nonsmokers with Matched Dietary Antioxidant Intakes. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2000; 71; 530-536
131. Roberts II LJ, Oates JA, Linton MRF, Fazio S, Meador BP, Gross MD, Shyr Y, Morrow JD. The Relationship between Dose of Vitamin E and Suppression of Oxidative Stress in Humans. *Free Radical Biology & Medicine*. 2007; Band 1-4
132. Carr AC, Zhu BZ, Frei B. Potential Antiatherogenic Mechanisms of Ascorbate (Vitamin C) and α -Tocopherol (Vitamin E). *Circulation Research*. 2000; 87; 349-354
133. Huang A, Vita JA, Venema RC, Keaney Jr JF. Ascorbic Acid Enhances Endothelial Nitric-Oxide Synthase Activity by Increasing Intracellular Tetrahydropterin. *Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275; 17399-17406
134. Mak S, Egri Z, Tanna G, Colman R, Newton GE. Vitamin C Prevents Hyperoxia-Mediated Vasoconstriction and Impairment of Endothelium-Dependent Vasodilation. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology*. 2002; 282; H2414-H2421
135. Sharma P, Raghavan SAV, Saini R, Dikshit M. Ascorbate-Mediated Enhancement of

- Reactive Oxygen Species Generation from Polymorphonuclear Leukocytes : Modulatory Effect of Nitric Oxide. *Journal of Leukocyte Biology*. 2004; 75; 1070-1078
136. Fennessy F, Moneley D, Wag J, Kelly C, Bouchier-Hayes D. Taurine and Vitamin C Modify Monocyte and Endothelial Dysfunction in Young Smokers. *Circulation*. 2003; 107; 410-415
 137. Frei B, England L, Ames BN. Ascorbate is an Outstanding Antioxidant in Human Blood Plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1989; 86; 6377-6381
 138. Grebe M, Eisele HJ, Weissmann N, Schaefer C, Tillmanns H, Seeger W, Schulz R. Antioxidant Vitamin C Improves Endothelial Function in Obstructive Sleep Apnea. *American Journal of Respiratory and Critical Care*. 2006; 173; 897-901
 139. Hamabe A, Takase B, Uehata A, Kurita A, Ohsuzu F, Tamai S. Impaired Endothelium-Dependent Vasodilation in the Brachial Artery in Variant Angina Pectoris and the Effect of Intravenous Administration of Vitamin C. *American Journal of Cardiology*. 2001; 87; 1154-1159
 140. Heitzer T, Brockhoff C, Mayer B, Warnholtz A, Mollnau H, Henne S, Meinertz T, Munzel T. Tetrahydrobiopterin Improves Endothelium-Dependent Vasodilation in Chronic Smokers : Evidence for A Dysfunctional Nitric Oxide Synthase. *Circulation Research*. 2000; 86; E36-E41
 141. Heitzer T, Just H, Munzel T. Antioxidant Vitamin C Improves Endothelial Dysfunction in Chronic Smokers. *Circulation*. 1996; 94; 6-9
 142. Hirai N, Kawano H, Hirashima O, Motoyama T, Moriyama Y, Sakamoto T, Kugiyama K, Ogawa H, Nakao K, Yasue H. Insulin Resistance and Endothelial Dysfunction in Smokers : Effects of Vitamin C. *American Journal of Physiology – Heart and Circulation Physiology*. 2000; 279; H1172-H1178
 143. Krajcovicová-Kudláčková M, Dusinskà M, Valachovicová M, Blazicek P, Pauková V. Short Communication – Products of DNA, Protein and Lipid Oxidative Damage in Relation to Vitamin C Plasma Concentration. *Physiological Research*. 2006; 55; 221-225
 144. Lehr HA, Frei B, Arfors KE. Vitamin C Prevents Cigarette Smoke-Induced Leukocyte Aggregation and Adhesion to Endothelium in Vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996; 91; 7688-7692
 145. Levine M, Conry-Cantilena C, Wang Y, Welch RW, Washko PW, Dhariwal KR, Park

- JB, Lazarev A, Graumlich JF, King J, Cantilena LR. Vitamin C Pharmacokinetics in Healthy Volunteers : Evidence for a Recommended Dietary Allowance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996; 93; 3704-3709
146. Liu L, Zhao SP, Gao M, Zhou QC, Li YL, Xia B. Vitamin C Preserves Endothelial Function in Patients with Coronary Heart Disease after a High-Fat Meal. *Clinical Cardiology*. 2002; 25; 219-224
 147. Pellegrini P, Newby DE, Johnston NR, Maxwell S, Webb DJ. Vitamin C Has No Effect on Endothelium-Dependent Vasomotion and Acute Endogenous Fibrinolysis in Healthy Smokers. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 2004; 44; 117-124
 148. Silvestro A, Scopaca F, Oliva G, de Cristofaro T, Iuliano L, Brevetti G. Vitamin C Prevents Endothelial Dysfunction Induced by Acute Exercise in Patients with Intermittent Claudication. *Atherosclerosis*. 2002; 165; 277-283
 149. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. Vitamin C Improves Endothelial-Dependent Vasodilation by Restoring Nitric Oxide Activity in Essential Hypertension. *Circulation*. 1998; 97; 2222-2229
 150. Tomiyama H, Kushiro T, Okazaki R, Yoshida H, Doba N, Yamashina A. Influences of Increased Oxidative Stress on Endothelial Function, Platelets Function, and Fibrinolysis in Hypertension Associated with Glucose Intolerance. *Hypertension Research*. 2003; 26; 295-300
 151. Tousoulis D, Antoniadis C, Tentolouris C, Tsioufis C, Toutouza M, Toutouzas P, Stefanadis C. Effects of Combined Administration of Vitamin C and E on Reactive Hyperemia and Inflammatory Process in Chronic Smokers. *Atherosclerosis*. 2003; 170; 261-267
 152. Heller R, Münscher-Paulig F, Gräbner R, Till U. L-Ascorbic Acid Potentiates Nitric Oxide Synthesis in Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1999; 274; 8254-8260
 153. Jackson TS, Xu A, Vita JA, Keaney Jr JF. Ascorbate Prevents the Interaction of Superoxide and Nitric Oxide Only at Very High Physiological Concentrations. *Circulation Research*. 1998; 83; 916-922
 154. Padayatty SJ, Sun H, Wang Y, Riordan HD, Hewitt SM, Katz A, Wesley RA, Levine M. Vitamin C Pharmacokinetics : Implications for Oral and Intravenous Use. *Annals of Internal Medicine*. 2004; 140; 533-537

155. Balletshofer BM, Rittig K, Stock J, Häring HU. Indikatoren einer beginnenden Atherosklerose : Erfassung der endothelialen Dysfunktion mittels hochauflösendem Ultraschall. *Ultraschall in der Medizin*. 2003; 24; 153-161
156. Enderle MD, Pfohl M, Kellermann N, Haering HU, Hoffmeister HM. Endothelial Function, Variables of Fibrinolysis and Coagulation in Smokers and Healthy Controls. *Hemostasis*. 2000; 30; 149-158
157. Gaenzer H, Neumayr G, Marschang P, Sturm W, Kirchmair R, Patsch JR. Flow-Mediated Vasodilation of the Femoral and Brachial Artery Induced by Exercise in Healthy Nonsmoking and Smoking Men. *Journal of the American College of cardiology*. 2001; 38; 1313-1319
158. Carabello RS, Giovino GA, Pechacek TF, Mowery PD, Richter PA, Strauss WJ, Sharp DJ, Eriksen MP, Pirkle JL, Maurer KR. Racial and Ethnic Differences in Serum Cotinine Levels of Cigarette Smokers. *Journal of the American Medical Association*. 1998; 280; 135-139
159. Whincup PH, Gilg JA, Emberson JR, Jarvis MJ, Feyerabend C, Bryant A, Walker M, Cook DG. Passive Smoking and Risk of Coronary Heart Disease and Stroke : Prospective Study with Cotinine Measurement. *British Medical Journal*. 2004; 329; 200

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. D. Sedding, der diese Arbeit betreute sowie Dr. Mathias Grebe möchte ich für die Überlassung der Arbeit sowie für die fachliche Unterstützung herzlich danken. Herr Dr. Grebe führte die Ultraschalluntersuchungen und die damit verbundenen Auswertungen durch, was mit einem enormen zeitlichen Aufwand verbunden war. Zudem unterstütze er mich sehr in fachlicher Hinsicht, worüber ich ihm sehr dankbar bin.

Frau Dr. H. Wollersen und Herr Dr. F. Erdmann unterstützten die Arbeit mit der Durchführung der Messung der Kotininkonzentration. Herr Prof. Dr. Dr. N. Katz führte wiederum die Messung der laborchemischen Parameter durch. Allen gilt mein herzlicher Dank.

Frau C. Scheibelhut und Herrn Dr. R. – H. Bödeker leisteten wertvolle Hilfe bei der Analyse und Durchführung der Statistiken, die in diese Arbeit Eingang fanden. Auch ihnen sei an dieser Stelle herzlich gedankt.

Herrn Prof. Dr. M. Kaps danke ich für die zur Verfügung gestellten Zeit, um die vorliegende Dissertation neben dem Klinikalltag vollenden zu können.

Ein Dankeschön gebührt zudem Frau MTA S. Schäfer für die große Unterstützung hinsichtlich der Probenannahme und deren weiterer Verarbeitung.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinem Ehemann Dr. Sven Mehlhorn, der mir sowohl eine große Motivationshilfe als auch ein kritischer Korrekturleser war. Des Weiteren danke ich meinen Eltern Karin und Horst Ciesiolka, die mich stets mit allen Ihnen zur Verfügung stehenden Mitteln unterstützt haben.

Ich erkläre : Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus – Liebig – Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“